

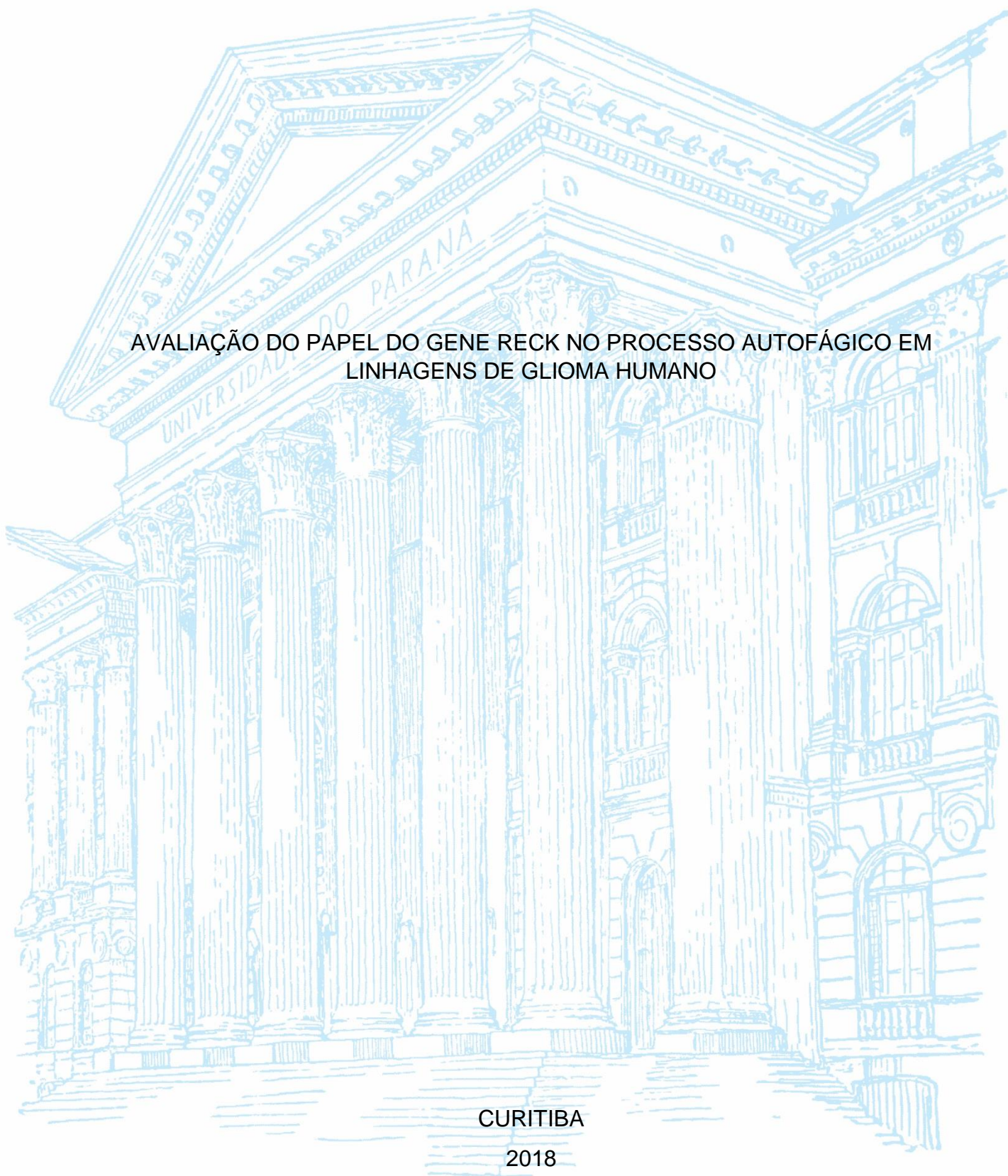
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LISLEY JANOWSKI SPISILA

AVALIAÇÃO DO PAPEL DO GENE RECK NO PROCESSO AUTOFÁGICO EM
LINHAGENS DE GLIOMA HUMANO

CURITIBA

2018



LISLEY JANOWSKI SPISILA

AVALIAÇÃO DO PAPEL DO GENE RECK NO PROCESSO AUTOFÁGICO EM
LINHAGENS DE GLIOMA HUMANO

Trabalho de Conclusão de Curso de
Biomedicina, Setor de Ciências Biológicas -
Departamento de Bioquímica e Biologia
Molecular, Universidade Federal do Paraná,
como requisito parcial à obtenção do grau de
bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Profa. Dra. Sheila Maria Brochado
Winnischofer

Coorientadora: Ms. Juliana Müller Bark

CURITIBA

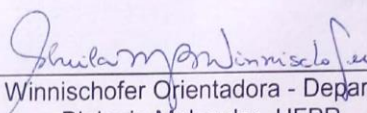
2018

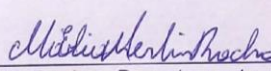
TERMO DE APROVAÇÃO

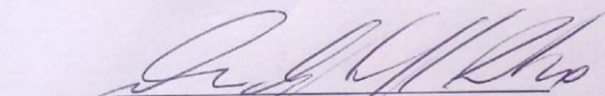
LISLEY JANOWSKI SPISILA

AVALIAÇÃO DO PAPEL DO GENE RECK NO PROCESSO AUTOFÁGICO EM
LINHAGENS DE GLIOMA HUMANO

Monografia aprovada como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel,
Curso de Biomedicina, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do
Paraná. Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:


Profª Drª Sheila M. B. Winnischofer Orientadora - Departamento de Bioquímica
e Biologia Molecular- UFPR


Profª Drª Maria Eliane Merlin Rocha - Departamento de Bioquímica e Biologia
Molecular- UFPR


Profª Drª Andrea Senff Ribeiro - Departamento de Biologia Celular e Molecular- UFPR

Curitiba, 14 de dezembro 2018.

*Dedico este trabalho às duas estrelas mais brilhantes que residem no céu:
Minha vózinha, Dona Suzana e meu vôzinho, Sr. Floriano. Saudades eternas.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me proporcionar as conexões desta vida.

Aos meus pais, por me ensinarem a amar incondicionalmente.

Às minhas irmãs, por serem parte do meu coração.

À minha família, por todo o carinho e incentivo.

À minha orientadora, prof. Sheila por todo o apoio, otimismo, compreensão e confiança, e por me inspirar a ser a pesquisadora, a mulher e a mãe que é.

À minha coorientadora, Ju Bark, por me ensinar tudo o que sei de cultivo, por me fazer amar ainda mais a pesquisa, por estar sempre presente, mesmo com oceanos de distância, por me escutar e me ajudar independentemente de qualquer coisa, por morar no meu coração.

Ao grupo de oxidações biológicas, em especial aos Sheilets (Ju, Ester, Rafa, Carol, Henrique, Mari, Rute e Tonn), Ana Paula, Diego, André, Eduardo e Sarinhah.

Às técnicas Beth e Jainy, por todo o suporte técnico e emocional.

Aos presentes que a vida me deu: Andressa, Ema, Nicoli, Jainy, Anderson e Gab.

A todos que de alguma forma acreditaram em mim quando eu mesma duvidei.

“Dum spiro, spero;

Dum spero, amo;

Dum amo, vivo.”

-Autor desconhecido

RESUMO

Gliomas são as neoplasias mais comuns que afetam o sistema nervoso central. Dentre eles, destacam-se os glioblastomas (GBMs), que são astrocitomas de maior grau de malignidade. Embora as terapias atuais envolvam remoção cirúrgica, quimioterapia e radioterapia, a taxa de sobrevivência é em média 15 meses. A temozolomida (TMZ) é o quimioterápico padrão atualmente utilizado, no entanto, vários mecanismos de resistência já foram descritos. Mecanismos como a administração de TMZ e a privação nutricional, são fatores que contribuem para o aumento dos índices autofágicos nas células. A inibição da sinalização de Notch1 induz o processo autofágico em GBM, com concomitante redução de proliferação celular. De forma interessante, a proteína RECK em sua forma canônica (RECKA) atua como inibidor indireto de Notch1, e em GBM foi visto que tal inibição atua sob GSC (glioma stem cells), gerando maior sensibilidade das células aos tratamentos. Recentemente, o transcrito alternativo RECKB foi descrito, mostrando papéis antagônicos à forma canônica, promovendo proliferação e invasão tumoral. Diante desse contexto, este trabalho tem por objetivo avaliar a modulação do processo autofágico em linhagens de GBM que superexpressam RECKA e RECKB e correlacionar com responsividade à TMZ (100µM) e o carenciamento de soro bovino fetal (72h) para avaliar resistência tumoral. Foram realizadas análise de número de células (por absorbância), marcação por laranja de acridina (AO), formação de esferoides pela técnica de *hanging drops*, análises de expressão de LC3I/II (nível de RNA e proteína) e análises de bioinformática. Os resultados mostraram que o tratamento com TMZ altera o número de células das linhagens U87MG parental, U87MG-EGFP e U87MG-RECKA, mas não a linhagem U87MG-RECKB. Marcações por AO mostraram elevado processo autofágico na linhagem U87MG-RECKB, sugerindo este um mecanismo de sobrevivência celular. Já a deprivação por soro demonstrou redução significativa de viabilidade celular para todas as linhagens, em especial para a linhagem U87MG-RECKA, que apesar de mostrar uma tendência de menor número de células, marcadas por AO, observou-se marcação menos intensa se comparada com a linhagem U87MG-RECKB. A capacidade de formação de esferoides não foi alterada pela expressão de RECKA ou RECKB, mas novamente observa-se que os esferoides formados a partir da linhagem U87MG-RECKB apresentaram índices elevados de marcação com AO. Correlação da expressão de RECK e Notch1, assim como associação de SNPs relacionados com agressividade tumoral, não foram observados em amostras de GBM. Em conjunto, nossos dados sugerem que a autofagia possa atuar como mecanismo de sobrevivência em especial para a linhagem U87MG-RECKB.

Palavras-chave: Glioblastoma, Temozolomida, RECK, autofagia, carenciamento por soro.

ABSTRACT

Gliomas are the most common neoplasms that affect the central nervous system. Among them, glioblastomas (GBMs), which are astrocytomas of a higher degree of malignancy, stand out. Although current therapies involve surgical removal, chemotherapy and radiotherapy, the survival rate is on average 15 months. Temozolomide (TMZ) is the standard chemotherapy currently used, however, several mechanisms of resistance have been described. Mechanisms such as TMZ administration and nutritional deprivation are factors that contribute to the increase of autophagic indices in the cells. Inhibition of Notch1 signaling induces the autophagic process in GBM, with concomitant reduction of cell proliferation. Interestingly, the RECK protein in its canonical form (RECKA) acts as an indirect inhibitor of Notch1, and in GBM it was seen that such inhibition acts under GSC (glioma stem cells), generating greater sensitivity of the cells to the treatments. Recently, the RECKB alternative transcript has been described, showing roles antagonistic to the canonical form, promoting proliferation and tumor invasion. The objective of this study was to evaluate the modulation of the autophagic process in GBM lineages that overexpress RECKA and RECKB and to correlate with TMZ responsiveness (100 μ M) and fetal bovine serum (72h) to evaluate tumor resistance. Cell number analysis (by absorbance), acridine orange marking (AO), spheroid formation by hanging drops, LC3I / II expression analysis (RNA and protein level) and bioinformatics analysis were performed. The results showed that the TMZ treatment changes the number of cells from the parent U87MG, U87MG-EGFP and U87MG-RECKA lines, but not the U87MG-RECKB lineage. AO markers showed a high autophagic process in the U87MG-RECKB lineage, suggesting a mechanism of cell survival. Serum deprivation demonstrated a significant reduction in cell viability for all strains, especially for the U87MG-RECKA strain, which despite a tendency of a high number of cells, marked by AO, was observed to be less intense when compared to strain U87MG-RECKB. The ability of spheroid formation was not altered by the expression of RECKA or RECKB, but again spheroids formed from the U87MG-RECKB strain showed high rates of AO marking. Correlation of RECK and Notch1 expression, as well as the association of SNPs related to tumor aggressiveness, were not observed in GBM samples. Taken together, our data suggest that autophagy may act as a survival mechanism in particular for the U87MG-RECKB lineage.

Key words: Glioblastoma, Temozolomide, RECK, autophagy, serum depletion.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 Câncer	13
2.2 Organização do SNC	14
2.3 Gliomas	14
2.4 Glioblastomas	15
2.4.1 Tratamento de Glioblastomas	15
2.5.1 Autofagia em Gliomas e a Responsividade à Temozolomida	18
2.7 Via de Sinalização de Notch	18
2.8 RECK	19
4. OBJETIVOS	22
4.1 Objetivo Geral	22
4.2 Objetivos Específicos	22
5. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL	24
6. CRONOGRAMA	25
7. METODOLOGIA	25
7.1 Cultivo celular	25
7.1.1 Esterilização e manejo de materiais	25
7.1.2 Soluções e meio de cultura	25
7.2 Condições de cultivo	26
7.3 Linhagens celulares	28
7.6 Avaliação da expressão de RECKA e RECKB	30
7.6.1 Extração de RNA total	30
7.7 Avaliação da expressão proteica	30
7.7.1 Extração e quantificação de proteínas	30
7.7.2 Imunodeteção de proteínas	32
7.8 Análise estatística	32
7.9 Análises de Bioinformática	33
8. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
8.1 Responsividade celular à TMZ e correlação com o processo autofágico	33
8.2 Responsividade celular à privação de nutrientes e correlação com o processo autofágico	36
8.5 Avaliação da expressão gênica	41
8.5.1 Análise da expressão dos marcadores de autofagia	42

8.5.2 Análise de expressão de mRNA	43
8.6 Análises de bioinformática.....	43
8.6.1 Análise da expressão de RECK e Notch1 em pacientes com GBM a partir de amostragem de dados do TCGA	43
8.6.2 Análise da expressão de SNPs de RECK e Notch1	44
9. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	46
10. REFERÊNCIAS.....	48

1. INTRODUÇÃO

Tumores que acometem o sistema nervoso central (SNC) são chamados de maneira geral de gliomas. São os tumores mais invasivos e letais que acometem a região, correspondendo cerca de 17% do total (THAKKAR et al., 2014). Os astrocitomas são os gliomas mais prevalentes. Estes, por sua vez, podem ser ainda classificados de acordo com o grau de malignidade, sendo o glioblastoma (GBM) o que apresenta maior grau de malignidade (grau IV) e pior prognóstico. Este tumor acomete na maioria dos casos homens idosos, e a taxa de sobrevida média é de 15 meses, mesmo com tratamentos quimioterápicos, radioterápicos e cirúrgicos (LOUIS et al., 2016; TROMBETTA-LIMA et al., 2015).

Dentre as terapias atuais envolvidas no tratamento de GBM destaca-se o quimioterápico temozolomida (TMZ), que consiste em um agente alquilante que insere grupamentos metil no DNA, promovendo a parada do ciclo celular e posteriormente, a morte celular. Porém, a taxa de sobrevida dos pacientes diagnosticados com GBM e tratados com TMZ é de cerca de 20% após 5 anos de diagnóstico (PONTES et al, 2012; LEE, 2017). A baixa taxa de sobrevida destes pacientes pode ser justificada devido à natureza altamente heterogênea e infiltrativa do tumor (LEE, 2017). Além disso, a existência de uma série de processos celulares que promovem a sobrevivência da célula tumoral dificulta ainda mais a ação das terapias antineoplásicas atuais. Dentre estes processos destaca-se a autofagia.

Estudos mostram que o tratamento de diferentes linhagens celulares de glioma com TMZ induz a autofagia - processo celular de degradação de moléculas e organelas, atuando como um mecanismo protetor para as células tumorais (NATSUMEDA et al., 2011). Outro fator importante responsável pela indução de autofagia em células de GBM é a privação de nutrientes. Já é bem descrito, que a privação de nutrientes, estimula a formação do complexo ULK1-ATG13-FIP200, responsável pela iniciação do processo autofágico (DUNLOP; TEE, 2014). Um estudo realizado por Galan-Moya e colaboradores em 2014, mostrou que, de maneira interessante, a privação de nutrientes em células de GBM com características de células-tronco (GSC) induz autofagia e apoptose de maneira dependente da ativação de mTOR (EVA MARIA GALAN-MOYA, LUCAS TREPS, LISA OLIVER, HERVÁ CHNEIWEISS, FRANÇOIS M. VALLETE, NICOLAS BIDÈRE, 2014). Em GBM a modulação da autofagia é importante, pois já foi descrito que essas células possuem

maior sensibilidade aos mecanismos de degradação autofágica, do que ao processo de apoptose (LEFRANC; FACCHINI; KISS, 2007). Neste contexto, avaliar as consequências envolvidas na modulação da atividade autofágica das células apresenta-se como um objeto favorável de estudos sobre câncer (JAWHARI; VERDIER; DEATH, 2016; NIXON et al., 2013).

Atualmente diversas vias de sinalização têm sido estudadas e relacionadas com o processo autofágico. Em especial pode-se destacar a via dos receptores da família Notch, em especial, Notch1. Diversas evidências sugerem que a via de Notch1 afeta o tráfego autofagossomal (BARTH; KÖHLER, 2014) e que a inibição da via de Notch induz autofagia em diversos tipos de câncer (HALES; TAUB; MATHERLY, 2014). Em gliomas foi verificado que a inibição de Notch induz o processo autofágico, e de forma interessante o tratamento combinado de inibidores de Notch com inibidores de autofagia (cloroquina) promoveu inibição de proliferação, clonogenicidade e induziu morte celular por apoptose (NATSUMEDA et al., 2016).

De forma interessante, a glicoproteína RECK (uma glicoproteína ancorada à membrana que atua como inibidor de diversas MMPs (metaloproteinases de matriz) e ADAM10 (proteína com atividade disintegrina e metaloproteinase tipo 10) está associada à sinalização de Notch1. Em trabalho realizado por Muraguchi e colaboradores, mostrou que RECK inibe a atividade proteolítica de ADAM10 (proteína desintegrina e metaloproteinase que contém domínio 10), que possui o mecanismo de induzir a sinalização de Notch em células embrionárias cerebrais. Dessa maneira, RECK demonstrou ser inibidor fisiológico de ADAM10 e indiretamente um regulador na sinalização de Notch (MURAGUCHI et al., 2007). Ainda, mais recentemente em modelo de câncer gástrico, foi verificado que RECK inibe tanto características fenotípicas quanto a expressão de genes associados ao fenótipo de células tronco, por inibir a ativação de Notch1 mediada por ADAM10 (HONG et al., 2014).

Diante disso, torna-se interessante avaliar o papel do gene *RECK* em modular o processo autofágico em modelo de glioma humano, correlacionando com fenótipo de agressividade e resistência ao quimioterápico TMZ. Além disso, sabe-se que modelos de cultura 3D mimetizam o microambiente *in vivo*, promovendo maior interação célula-célula e célula-microambiente tumoral, sendo capaz de diminuir a sensibilidade intrínseca das células ao tratamento quimioterápico (BERENS et al., 2015), desta forma, esse projeto visa também avaliar os níveis de autofagia e sua correlação com

a modulação da expressão do gene *RECK* utilizando a metodologia de cultivo celular em neuroesferas por *hanging drop*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Câncer

Segundo definição apresentada pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA), câncer é um conjunto que compreende mais de 100 doenças que possuem como características comuns crescimento celular desordenado e potencial metastático (INCA, 2017).

O destacado estudo “*Hallmarks of câncer: The Next Generation*”, publicado por Hanahan & Weinberg em 2011, relata a existência de seis relevantes marcadores para o processo de desenvolvimento do câncer que auxiliam no processo de proliferação e metástase tumoral, que seriam: resistência à mecanismos de morte celular, indução à angiogênese sustentada, possibilidade de imortalidade replicativa, ativação de mecanismos de invasão celular e metástase, evasão de supressores tumorais e sustentação de sinais de proliferação celular (HANAHAHAN; WEINBERG, 2011). Estudos como o descrito acima, sobre a biologia do câncer, demonstram a necessidade de possuir abordagens específicas para doenças altamente heterogêneas, como são os diferentes tipos de câncer, não apenas em aspectos fenotípicos, como também em aspectos genotípicos.

A estimativa da *American Cancer Society* (ACS) para o ano de 2018 é de que ocorram 1.735.350 novos casos de câncer nos Estados Unidos, e destes, 609.640 possuam desfecho de óbito. Além disso, estima-se que 3% do total de mortes por câncer nos Estados Unidos ocorra em decorrência de tumor cerebral ou de outras regiões que envolvam o sistema nervoso (ACS, 2017).

Tumores de Sistema Nervoso Central (SNC) são o 13º mais frequente em homens e o 15º mais frequente em mulheres no mundo. Apesar de ser considerado relativamente raro, possui importante impacto na mortalidade mundial, principalmente na população mais jovem e em idosos. Tumores de GBM, compreendem cerca de 20% da totalidade de doenças malignas que acometem crianças e adolescentes (PAVLOVI et al., 2002).

As últimas estimativas da Globocan foram realizadas para o ano de 2012, na América Central e na América do Sul. Os resultados indicaram que o câncer de SNC correspondeu à 11ª causa de morbidade e mortalidade por câncer, e que cerca de 73% dos novos casos levaram os pacientes acometidos à óbito (PIÑEROS et al., 2016; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015).

No Brasil, no período que compreende 2018-2019, estima-se a ocorrência de 600 mil novos casos de câncer para cada ano, sendo que há uma taxa de incidência aproximadamente 12% maior em homens do que em mulheres. Em relação as estimativas de tumores que acometem o SNC, estima-se a ocorrência de 11.320 casos para o mesmo período supracitado (INCA, 2017).

2.2 Organização do SNC

A classificação anatômica para o SNC compreende a sua divisão em encéfalo (cérebro, tronco encefálico e cerebelo) e medula espinhal, sendo que as estruturas que se situam no crânio e medula são constituídas por neurônios e células da glia. Os neurônios são células responsáveis pelo processamento de sinais por meio de geração de impulsos nervosos e são auxiliados pelas células da glia, que promovem funções de sustentação, nutrição, sinalização e regulação destes sinais neuronais. A glia é composta por uma diversidade de tipos celulares, dentre eles: astrócitos, oligodendrócitos, endotélio e microglia (LENT, 2002). Os astrócitos são as mais numerosas células que compõem a glia e realizam função de orientação axonal, suporte sináptico, controle da barreira hematoencefálica e do fluxo sanguíneo (BLACKBURN et al., 2009).

2.3 Gliomas

Tumores que acometam qualquer célula da glia, podem ser chamados de gliomas e são os tumores de SNC mais comuns em adultos, correspondendo a cerca de 75% de todos os tumores que acometem o SNC (THAKKAR et al., 2014). Gliomas que acometem astrócitos, também chamados de astrocitomas, são os mais prevalentes. De acordo com a nova classificação dos tumores que acometem o sistema nervoso central (SNC), publicado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) no ano de 2016,

os astrocitomas correspondem a quase 70% da totalidade dos casos de tumores do SNC (LOUIS et al., 2016).

2.4 Glioblastomas

Astrocitomas podem ser classificados de diferentes formas. A classificação por análise histológica é a mais usual e divide os astrocitomas em quatro graus de acordo com a malignidade: astrocitoma pilocítico (grau I), astrocitoma difuso (grau II), astrocitoma anaplásico (grau III) e o glioblastoma (GBM) (grau IV). Os graus I e II correspondem a astrocitomas de baixo grau de malignidade e os de grau III e IV de alto grau de malignidade e por consequência, os de pior prognóstico. Atualmente, existe também uma classificação genotípica na qual compreendem dois importantes grupos de acordo com a expressão diferencial dos genes isocitrato desidrogenase (IDH) I e II, incorporando padrões moleculares e diagnóstico diferencial para a doença (COHEN; HOLMEN; COLMAN, 2013; LOUIS et al., 2016; PUDUVALLI; HOANG, 2018; REUSS et al., 2015).

Pacientes diagnosticados com GBM são em sua maioria homens idosos e sem o tratamento, possuem taxa de sobrevida média de 17 semanas. Porém, mesmo com o tratamento atual envolvendo quimioterapia, radioterapia e, quando possível, remoção cirúrgica, a taxa de sobrevida máxima ainda é bastante pequena, totalizando cerca de 15 meses (THAKKAR et al., 2014).

2.4.1 Tratamento de Glioblastomas

A temozolomida (TMZ) é o principal quimioterápico utilizado para o tratamento de glioblastomas de alto grau. Trata-se de um agente alquilante, que insere grupamentos metil no DNA, nas posições N₃ e N₇ da adenina e O₆ da guanina. Porém, mesmo com a efetividade de ação da TMZ, o GBM possui diversos mecanismos de resistência. O mecanismo de resistência tumoral à ação desse quimioterápico que mais se destaca é a maquinaria O⁶MeG DNA metiltransferase (MGMT), que remove as metilações que foram previamente inseridas pela ação da TMZ, eliminando assim o dano ao DNA gerado pela administração da droga e restabelecendo a alta capacidade proliferativa daquela célula e em maior escala, da massa tumoral (YAN et al., 2016). Tais mecanismos interferem na efetividade de ação da droga, o que faz com que seja

necessária a busca por fármacos coadjuvantes que possam potencializar o efeito antiproliferativo (TAYLOR; SCHIFF, 2015).

2.5 Autofagia

Autofagia é o nome do processo que envolve um caminho de degradação de moléculas do citoplasma ao lisossomo. A macroautofagia é um tipo de autofagia e consiste na degradação de componentes citoplasmáticos ou organelas, realizada através da fusão de autofagossomos com lisossomos, formando uma organela híbrida de membrana dupla chamada de autolisossomo. No caso de senescência ou defeitos celulares ocorre a clivagem e endereçamento do material a outras organelas em forma de geração de energia e aproveitamento de recursos para a célula. Este mecanismo ocorre em nível basal em células normais e é visto em diferentes processos celulares como sobrevivência, diferenciação, desenvolvimento e homeostasia, sendo regulados por diferentes genes *AuTophagy-related* (Atgs) (LIU et al., 2016; NIXON et al., 2013; WOLFE et al., 2013).

Na maioria dos estados patológicos, a autofagia é considerada um processo neuroprotetor induzido para aliviar os estresses celulares, como a privação de nutrientes, acúmulo de agregados proteicos e respostas a estímulos estressantes que correspondem a um ponto crítico adaptativo. Desta forma, a modulação da autofagia por meio de fármacos ou intervenções genéticas pode acelerar a morte celular (LIU et al., 2016; NIXON et al., 2013; WOLFE et al., 2013).

O processo autofágico pode ser dividido em iniciação, alongação, fechamento, maturação e degradação e é induzida por diferentes vias de sinalização que são mediadas pelo estresse celular. Estas vias agem através da proteína mTOR que inibe o processo autofágico pela formação de um complexo formado por ULK1, Atg13, FIP200 e Atg101 (Figura 1). Na presença de inibidores de mTOR, ocorre o desligamento de mTOR do complexo e o restabelecimento do fluxo autofágico, mesmo diante da privação de nutrientes e hipóxia (ROSENFELDT; RYAN, 2011).

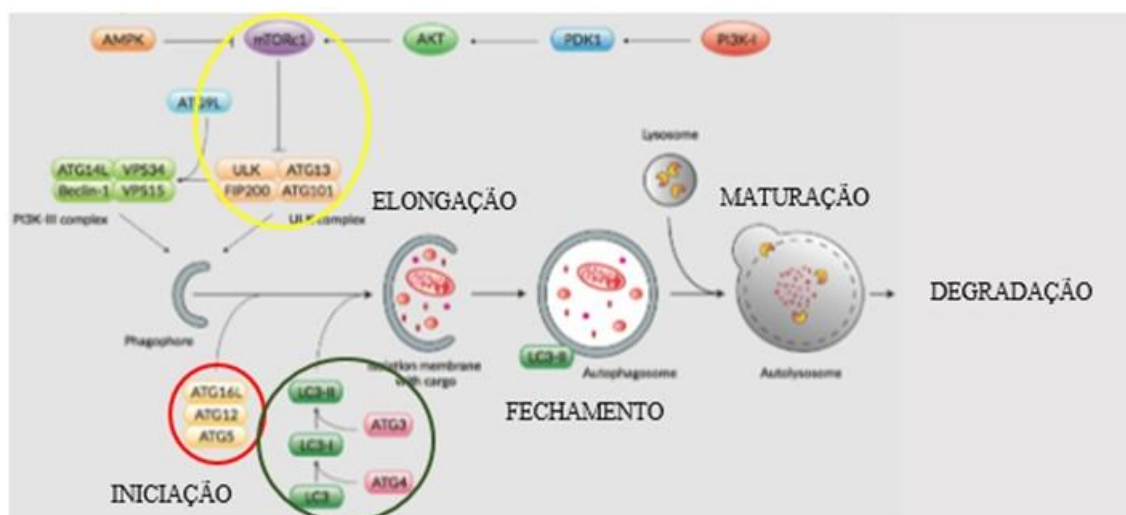


Figura 1. Etapas da autofagia. Na imagem acima é possível observar a organização das etapas de iniciação, alongação, fechamento, maturação e degradação do processo autofágico. No círculo vermelho é possível observar o início da etapa de formação do autofagossomo pela complexação de Atg5, Atg16 (também conhecido como Beclin-1) e Atg12. No círculo verde é possível observar a lipidação do Atg8 (LC3) e seu acoplamento à membrana do autofagossomo, passando a ser chamado de LC3II. E no círculo em amarelo, é possível observar a formação do complexo de mTOR com ULK1, Atg13, FIP200 e Atg101, que garante a inibição do processo de autofagia.

FONTE: O autor, adaptado de InVivoGen. Autophagy and Innate Immunity, 2017.

No câncer, a autofagia cumpre função dual, podendo promover a progressão ou inibição do tumor. Atuando tanto por mecanismos que suprimam a resposta tumoral, como por mecanismos que atuem auxiliando no estabelecimento e desenvolvimento do tumor (LIU et al., 2012).

Quando há falha no mecanismo autofágico das células, há redução de depuração de organelas danificadas e de expressão de p62 (um marcador da degradação do conteúdo do autofagossomo), gerando um acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROS) na célula. Isso altera as vias de sinalização do fator de necrose Nf-κB, favorecendo a sobrevivência celular. Além disso, pode gerar instabilidade genética, o que pode culminar em mutações de DNA e desenvolvimento de tumores, não apenas pela possibilidade de mutações que permitam a sobrevivência celular como também pela morte massiva de células por mecanismos necróticos, levando ao estabelecimento de respostas inflamatórias que favoreçam a pró-tumorigenicidade. Por outro lado, é importante ressaltar que no início do estabelecimento de uma massa tumoral, antes de haver mecanismos de angiogênese sustentada para manutenção do tumor, há situações de hipóxia e carência de nutrientes para as células, e indução no processo de autofagia podem permitir a sobrevivências destas células tumorais

(JAWHARI; VERDIER; DEATH, 2016; JIANG et al., 2009; ROSENFELDT; RYAN, 2011).

2.5.1 Autofagia em Gliomas e a Responsividade à Temozolomida

A autofagia é ativada nas células tumorais por agentes quimioterápicos e por radiação, e o processo é um alvo potencial para a terapia do câncer (NATSUMEDA et al., 2011). Em um estudo realizado por Fillippi-Chiela e colaboradores em 2015, foi visto que a autofagia induzida por TMZ parece ter um papel citoprotetor. E que o tratamento agudo com TMZ induz a inibição sustentada da via Akt-mTOR, resultando em uma indução transiente da autofagia, levando a célula a resistência ao tratamento quimioterápico (FILIPPI-CHIELA et al., 2016).

A resistência de GBM à quimioterapia propicia estudos sobre mecanismos de ação coadjuvante, que podem alterar a responsividade da célula a estes tratamentos. Neste contexto, Jiang e colaboradores, realizaram um *screening* de 22 drogas aprovadas pelo FDA que podem atuar como coadjuvantes no tratamento com TMZ, promovendo aumento da citotoxicidade em GBM e já estão sendo inseridas em ensaios clínicos (JIANG et al., 2014). De maneira interessante, outro estudo realizado por Fukai e colaboradores em 2014 observou um aumento do potencial antitumoral da temozolomida quando administrada em conjunto com o ácido zoledrônico (FUKAI; KOIZUMI; NAKAO, 2014).

Em gliomas foi verificado que o uso de inibidores de Notch induzem o processo autofágico, e de forma interessante o tratamento combinado de inibidores de Notch com inibidores de autofagia (cloroquina) promoveu inibição de proliferação, clonogenicidade e induziu morte celular por apoptose (NATSUMEDA et al., 2016), e forma interessante, recentemente foi verificado que a autofagia inibe a capacidade de auto-regeneração de células tronco de glioma promovendo alteração na via de Notch1 (Tao et al., 2018). Porém, ainda são necessários mais estudos sobre o tema para melhor compreensão dos mecanismos envolvidos.

2.7 Via de Sinalização de Notch

Além do processo autofágico, outro fator que também está relacionado com a resistência dos gliomas, é a sinalização de Notch. Estudos apontam que a ativação

de Notch desencadeia processos celulares importantes como a migração, proliferação e vascularização de células tumorais, causando progressão de neoplasias malignas. Em GBM, Notch está relacionado ao processo de vascularização, colaborando com prognóstico ruim da doença (KANAMORI et al., 2007).

Outro fator importante envolvido na sinalização de Notch é a autorrenovação de células tronco cerebrais normais, que quando ativada de forma excessiva pode contribuir para o desenvolvimento de tumorigenicidade nestas células. Esta sinalização excessiva, quando presente em células tronco tumorais de GBM está relacionada com o fenótipo de resistência à radiação e quimioterapias (RANGANATHAN; WEAVER; CAPOBIANCO, 2011). Células tronco tumorais presentes em gliomas malignos possuem uma atividade elevada de Notch ocasionando a autorrenovação celular, sendo ainda relacionado ao fenótipo de resistência à radiação e quimioterapias (SARKAR et al., 2017). Desta forma, vias de sinalização mediadas por Notch são alvos interessantes no processo tumorigênico e podem significativamente melhorar a terapias para gliomas.

2.8 RECK

O gene RECK (Reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs), que codifica para uma glicoproteína ancorada à membrana por GPI (glicosilfosfatidilinositol) de cerca de 110 kDa, é denominado RECKA ou RECK canônico. Esta proteína apresenta atividade de supressão tumoral, associada com a regulação negativa de membros da família das metaloproteinases de matriz extracelular (MEC), em especial: MMP-9, MMP-2 e MT1-MMP, atuando em processos de angiogênese sustentada, processos de invasão e metástase. (BERGERS et al., 2010; OH et al., 2001).

Recentemente, Trombetta-Lima e colaboradores descreveram transcritos alternativos para RECK. Foi visto que tais transcritos alternativos exibem padrões de expressão distintos em diferentes tecidos se comparados ao RECK canônico. Além disso, esses transcritos variantes de RECK parecem possuir papéis antagônicos na biologia de GBM. Uma representação esquemática de um desses transcritos alternativos de *splicing*, denominado RECK-B, em comparação com o transcrito

canônico RECK-A pode ser visualizado na Figura 2. Interessantemente, a expressão de RECK-B relaciona com aumento de crescimento celular dependente de ancoragem, o que sugere maior potencial de malignidade. Em GBM, a razão de expressão entre RECK-A e RECK-B relaciona diretamente com o prognóstico do paciente. Caso propicie a maior expressão de RECK-A, há uma maior taxa de sobrevida geral dos pacientes. Porém, se a expressão de RECK-B for mais prevalente, há uma menor taxa de sobrevida, com concomitante aumento do potencial invasivo das células neoplásicas. Além disso, linhagens de GBM que superexpressam RECK-A não demonstraram alterações de crescimento celular ou alteração do potencial clonogênico das células, porém, linhagens que superexpressam RECK-B mostraram importante aumento da independência de ancoragem e crescimento celular, o que sugere possível função pró-oncogênica deste transcrito (TROMBETTA-LIMA et al., 2015).

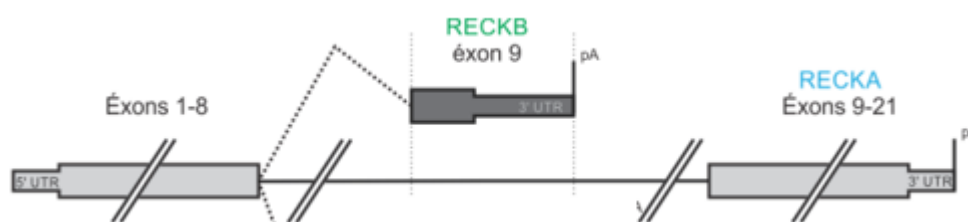


Figura 2. Representação esquemática do transcrito alternativo RECK-B. O gene RECK possui diferentes transcritos alternativos. Neste trabalho, destaca-se a isoforma RECK-B, que compartilha os éxons de 1-8 com a forma canônica e possui apenas o nono éxon diferente.

FONTE: Adaptado de Jacomasso, Thiago; 2014.

De forma interessante, a partir do trabalho realizado no nosso grupo de pesquisa pela aluna Fernanda Ramiro em 2017, foi verificada, através de dados de microarranjo de DNA presentes no banco de pesquisa GEODatasets, uma correlação negativa entre a expressão de RECK e de Notch1 (Figura 3), corroborando com outros dados prévios da literatura que mostram que a ativação excessiva de Notch1 estaria associada com um mal prognóstico ao paciente, enquanto RECK estaria associado com um melhor prognóstico (RANGANATHAN; WEAVER; CAPOBIANCO, 2011; SARKAR et al., 2017; RAMIRO et al., 2017).

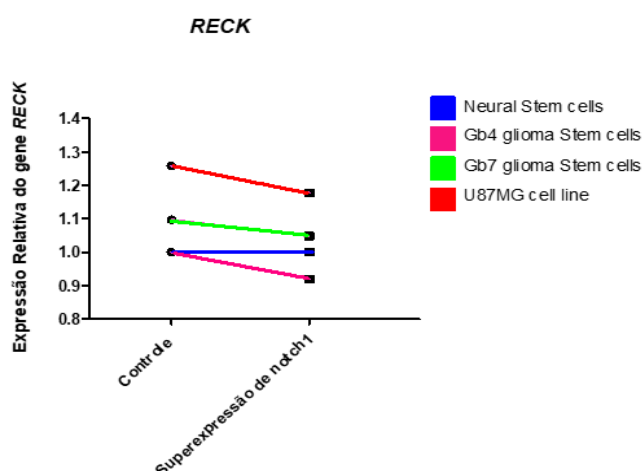


Figura 3. Análise da modulação da expressão do gene *RECK* em amostras com superexpressão de *notch1*, em comparação com as células parentais controle. As amostras foram obtidas através da análise no banco de dados públicos de microarranjos de DNA (*GEODataset*) identificado em *GSE44561*. Os dados selecionados para representar o grupo controle são amostras de células tronco humanas, obtidas de quatro amostras distintas, tecido neural humano, células de linhagens primárias de glioma Gb4 e Gb7 e células da linhagem de glioma humano U87MG (representados pelos pontos). Posteriormente, as mesmas amostras foram superexpressas com NICD (Notch1 na forma intracelular) representadas pela forma de quadrado. Observa-se a modulação negativa da expressão de RECK nas células superexpressas com *notch1*. Análises estatísticas não foram significativas ($P > 0,05$).

FONTE: Ramiro, C. Fernanda *et al*, 2018.

2.8 Técnicas de cultivo em 3D

Atualmente, a grande maioria dos estudos em câncer realizados *in vitro* consistem no cultivo de células em modelos 2D, no entanto, a busca por novas formas de cultivo que se assemelhem ao microambiente tumoral para estudos *in vitro* tem sido uma importante ferramenta para o entendimento da biologia celular tumoral (LEDUR *et al.*, 2017). Visando modelos que promovam o estudo das interações célula-célula ou célula-microambiente tumoral e aspectos de arquitetura e funcionamento celular vistos em ambientes *in vivo*, diferentes técnicas estão sendo utilizadas na literatura para otimização da formação de neuroesferas, incluindo o modelo de cultura em *hanging drops* (WEISWALD; BELLET; DANGLES-MARIE, 2015). Um estudo recente mostrou que a formação de neuroesferas na linhagem U87MG aumenta a marcação por CD133+ (marcador clássico de enriquecimento de CSCs), e de modo interessante, a autofagia atua regulando a autorrenovação e tumorigenicidade de GSCs, dependente da atividade de Notch1 (TAO *et al.*, 2018). Além disso,

metodologias em 3D, auxiliam no entendimento da atividade das GSCs, logo, entender como os GSCs sobrevivem e interagem com o microambiente no qual estão inseridos, é de grande importância para o desenvolvimento futuro de estratégias específicas anti-GBM (EVA MARIA GALAN-MOYA, LUCAS TREPS, LISA OLIVER, HERVÁ CHNEIWEISS, FRANÇOIS M. VALLETE, NICOLAS BIDÈRE, 2014).

3. JUSTIFICATIVA

GBM apresenta alto potencial de invasividade, malignidade e complexidade molecular, que culminam com a não responsividade do tumor às terapias convencionais. Isso se deve a existência de diversos mecanismos de resistência, dentre eles, a autofagia. A inibição da autofagia potencializa a ação dos quimioterápicos como a TMZ. Desta forma, é interessante avaliar a modulação da autofagia em modelos de glioma.

A modulação da via de Notch têm sido correlacionada com o processo autofágico. RECK é um inibidor de Notch1 e está correlacionado com um melhor prognóstico dos pacientes com glioma. Desta maneira, avaliar se a modulação da expressão do gene *RECK* é capaz de alterar os níveis autofágicos das células, assim como a responsividade ao quimioterápico TMZ, torna-se uma interessante possibilidade de estudo. Além disso, a correlação da expressão de RECK com a via de sinalização de Notch1 pode ser também explorada.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

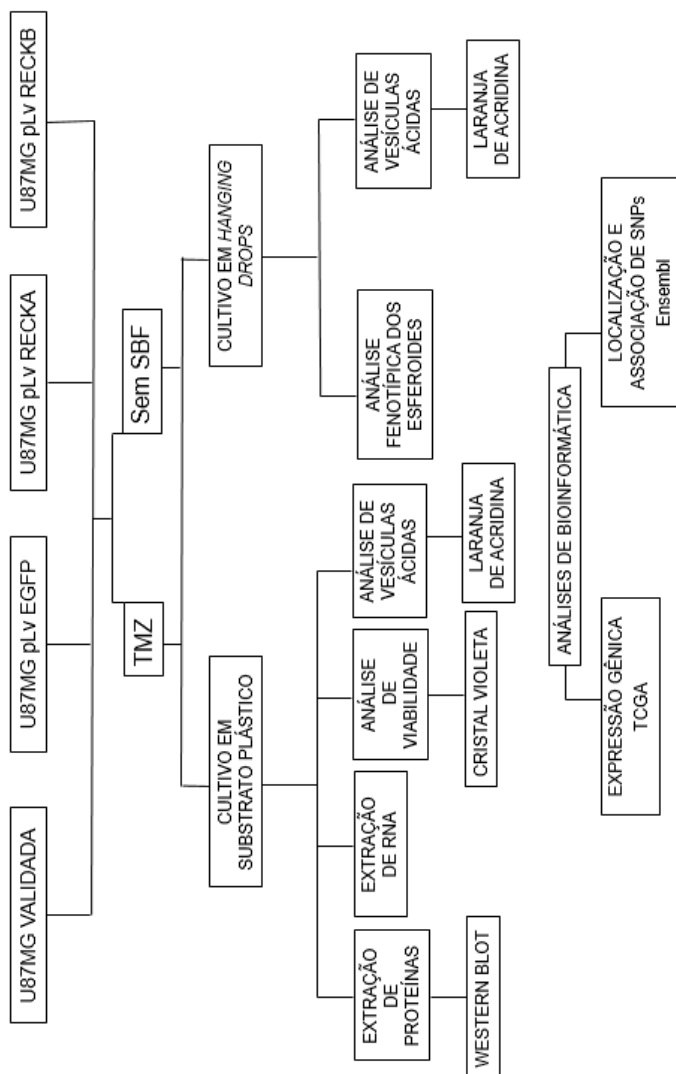
Avaliar a capacidade do gene *RECK* modular o processo autofágico em células de glioblastoma humano (GBM).

4.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a responsividade de células de glioblastoma humano (U87MG) que superexpressam RECK-A e RECK-B frente ao quimioterápico TMZ.

- Avaliar a responsividade de células de glioblastoma humano (U87MG) que superexpressam RECK-A e RECK-B frente ao carenciamento de soro bovino fetal.
- Avaliar a capacidade de formação de esferoides de células de glioblastoma humano (U87MG) que superexpressam RECK-A e RECK-B.
- Avaliar a indução do processo de autofagia em células de glioblastoma humano (U87MG) que superexpressam RECK-A e RECK-B nas diferentes condições: após tratamento com TMZ, após carenciamento por soro ou após a formação dos esferoides.
- Avaliar a correlação de RECK e Notch1 em amostras de glioblastomas humano através de ferramentas de bioinformática.

5. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL



6. CRONOGRAMA

Período de 2018	Etapas de realização
Janeiro	-
Fevereiro	Aprovação do colegiado
Março	Definição do projeto
Abril	Revisão
Maio	Revisão
Junho	Apresentação do projeto
Julho	Cristal Violeta e Laranja de Acridina
Agosto	Extração de proteínas
Setembro	Extração de RNA
Outubro	Western blot
Novembro	Finalização dos experimentos e escrita
Dezembro	Apresentação da monografia

7. METODOLOGIA

7.1 Cultivo celular

7.1.1 Esterilização e manejo de materiais

Todos os materiais e vidrarias utilizados para os procedimentos de cultivo celular (frascos para soluções e meio de cultura, equipamento para filtração de soluções, tampas, ponteiros plásticos para pipetas e pipetas de vidro) foram esterilizados em autoclave a 120°C, durante 45 minutos e sob pressão de 1 atm. Após a esterilização, o material foi seco em estufa a 50°C. O manejo das culturas de células foi realizado em condições de esterilidade, no interior de capela de fluxo laminar.

7.1.2 Soluções e meio de cultura

7.1.2.1 PBS

A solução salina-fosfato tamponada (PBS) foi preparada como uma solução estoque concentrada cinco vezes, sendo que esta solução estoque é constituída por 680 mmol/L de NaCl, 13,4 mmol/L de KCl e 40,5 mmol/L de Na₂HPO₄. Esta também teve seu pH ajustado para 7.4, sendo esterilizada em autoclave da marca Fanem a

120°C, durante 45 minutos, sob pressão de 1 atm e armazenada em temperatura ambiente ou a 4°C.

7.1.2.2 Tripsina

A solução de tripsina-EDTA utilizada para soltar as células cultivadas de forma aderente nas garrafas constitui-se de 137 mmol/L de NaCl, 5.4 mmol/L de KCl, 5 mmol/L de glucose, 0,42 mmol/L de Na₂HPO₄, 0,44 mmol/L de KH₂PO₄, 2.3 mmol/L de NaHCO₃, 0,53 mmol/L de EDTA e 50 mg/L de tripsina, e teve seu pH ajustado para 7,4. O indicador de pH utilizado foi o vermelho de fenol 15 mg/L. Esta solução foi esterilizada por filtração em membrana estéril com poro de 0,22 µm (Millipore) sob pressão em aparelho Sartorius, em câmara de fluxo laminar vertical (VECO) e armazenada a -20°C.

7.1.2.3 Meio de cultura DMEM Alta Glucose

O meio de cultura DMEM alta glucose (Sigma) é reconstituído em água ultrapura em pH ajustado em 7,4. O ajuste do pH do meio foi realizado pela adição de NaHCO₃ estéril (autoclavado). O meio foi esterilizado por filtração em membrana de acetato-nitrato de celulose com poro de 0,22 µm. sob pressão em aparelho Sartorius, em câmara de fluxo laminar vertical (VECO). Para os experimentos, o meio DMEM alta glucose foi suplementado com 10% de soro fetal bovino estéril (SFB; Gibco) e 100µg/mL do antibiótico estreptomicina e 100 U/mL de penicilina. Também foi utilizado meio DMEM A. G. sem suplementação de SBF para fins de carenciamento celular e modulação autofágica.

7.2 Condições de cultivo

As células foram cultivadas como cultura aderente em garrafas plásticas (poliestireno) estéreis, mantidas com meio de cultura (DMEM alta glucose) suplementado com 10% soro fetal bovino e penicilina e estreptomicina. As células serão mantidas em estufa a 37°C, sob atmosfera contendo 5% de CO₂. A subcultura foi realizada de acordo com a confluência das células, sendo utilizada a solução

salina-fosfato tamponada (PBS 1X) para lavagem, e em seguida a solução de tripsina-EDTA para o desprendimento das mesmas.

As mesmas linhagens foram cultivadas em condições com DMEM 10% de SFB e após obterem confluência adequada, foram plaqueadas por contagem em câmara de Neubauer. As células foram plaqueadas em placas p100, na densidade de 7×10^5 células por placa e em placas p96, na densidade de 4×10^3 células por poço e, após 24hr decorridas do plaqueamento, metade do volume total de células terão seu meio carenciado. As células também foram submetidas ao tratamento de TMZ [100 μ M] para terem os mecanismos de morte celular induzidos.

Para a cultura em *hanging drops*, as células foram plaqueadas na densidade de 1×10^3 células por gota em 25 μ L de DMEM A.G. com 10% de SBF por gota, por um período de 72 horas. Após esse período, foram transferidas para placas recobertas com poly-HEMA 1.2% por 5 dias, nas condições com 10% de SBF e sem SBF, em seguida feitas análises fenotípicas e os esferoides foram dissociados e marcados com laranja de acridina.

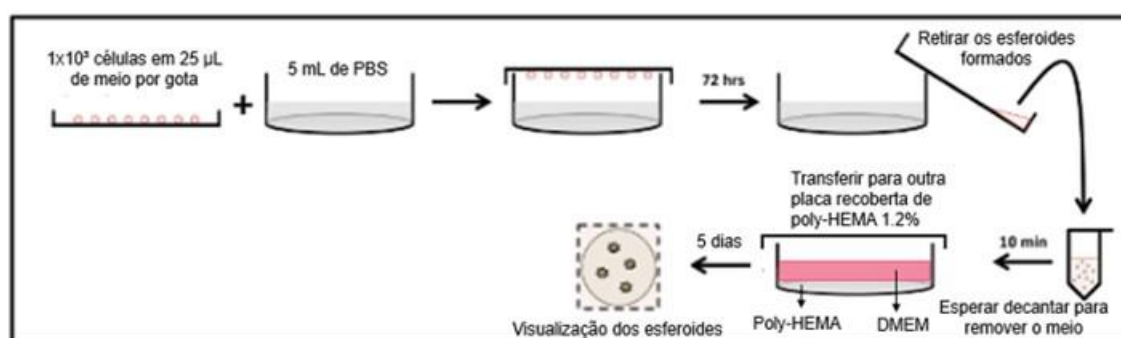


Figura 4. Metodologia para formação de *hanging drops*. Conforme já padronizado em nosso laboratório pela Ms. Juliana Müller Bark, 2017. As células serão plaqueadas em placas p100, na densidade de 1×10^3 células em um volume de 25 μ L por gota de meio de cultura DMEM, enriquecido com 10% de SBF. Após um período de 72 horas, serão transferidas para um microtubo estéril até que haja a decantação completa dos esferoides. Havendo a decantação, as células terão seu meio removido e serão ressuspensas em meio DMEM enriquecido com 10% de SBF ou em meio DMEM sem SBF e transferidas para novas placas p100 recobertas com poly-HEMA 1.2% para evitar adesão, permanecendo neste ambiente por 5 dias. Em seguida, serão feitas análises comparativas do número e morfologia dos esferoides e os mesmos serão dissociados e marcados com laranja de acridina para avaliar se há diferenças no processo autofágico entre as linhagens.

FONTE: O autor, adaptado de BERENS *et al*, 2015.

7.3 Linhagens celulares

Foram utilizadas células modificadas e parentais da linhagem U87MG que correspondem a linhagens de grau IV de GBM. Estas foram cedidas pelo Núcleo de Terapia Celular e Molecular (NUCEL/NETCEM) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FM-USP). As células utilizadas estão presentes na tabela abaixo:

Tabela 1. Linhagens parental e modificadas utilizadas.

Nomenclatura	Modificações
U87MG Validada	Linhagem parental
U87MG pLv EGFP	Controle da superexpressão
U87MG pLv RECK-A	Superexpressão de RECK-A
U87-MG pLv RECK-B	Superexpressão de RECK-B

Para os ensaios de superexpressão do quadro aberto de leitura (open Reading frame – ORF) dos transcritos de RECK foram clonadas as sequências amplificadas destas ORFs em um vetor lentiviral de superexpressão, gerando os plasmídeos chamados de pLv-RECKA (superexpressão de RECKA) e pLV-RECKB (superexpressão de RECKB). Como controle foi gerado um vetor sem nenhuma inserção no sítio de restrição. Este plasmídeo controle foi chamado de pLV-EGFP. A preparação dos vetores e o procedimento de produção de partículas lentivirais e infecção das células foi realizado pelo grupo da Profa. Mari C. Sogayar, da Universidade de São Paulo.

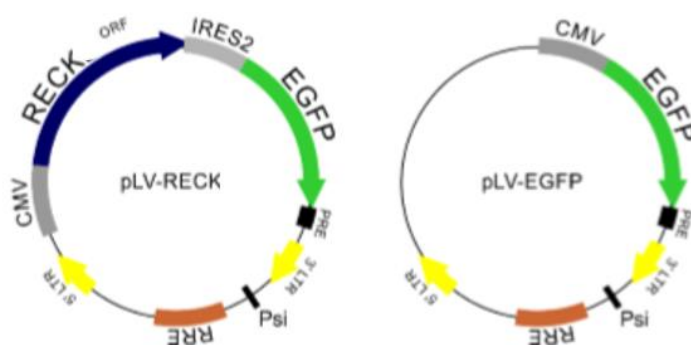


Figura 5. Representação esquemática dos vetores utilizados para geração das linhagens com superexpressão de RECK A e RECKB e do controle pLV-EGFP.

NOTA: Esquema dos plasmídeos utilizados na superexpressão de RECKA e RECKB. Na superexpressão do quadro aberto de leitura dos transcritos alternativos de RECK: RRE, Rev Responsive Element; LTR, Long Terminal Repeats; CMV, promotor de citomegalovirus. EGFP, Enhanced Green Fluorescent Protein; IRES2, internal ribosome entry site; PRE, posttranscriptional regulatory element.

FONTE: Jacomasso, T.; 2014.

7.4 Avaliação de viabilidade celular por Cristal Violeta

As células foram plaqueadas em placas p96 na densidade de 4×10^3 células/poço em 200 μ L por poço. Após 24 horas para que ocorresse a adesão celular, as células foram tratadas em quintuplicatas nas condições: controle (DMEM 10% SBF), DMSO 0,1%, TMZ 100 μ M e DMEM A.G. sem SBF, por um período de 72 horas. Após esse período, o meio foi retirado, as células foram lavadas com PBS1X resfriado e incubadas com 100 μ L de metanol 100% por 10 minutos, para que houvesse a fixação das células. Após esse período, o metanol foi retirado e foram acrescentados 50 μ L de solução de cristal violeta (0,2% cristal violeta em 2% de etanol) incubado por 3 minutos. Após esse período, foram realizadas diversas lavagens com PBS 1X, até que todo o excesso de corante fosse removido. Em seguida, foram acrescentados 200 μ L de citrato de sódio em cada poço, e em poços vazios, para se obter o valor do “branco” do experimento. Em seguida, a placa foi submetida à leitura no equipamento Epoch com absorbância de 545 nm.

As concentrações de TMZ e DMSO, o tempo de cultivo e a densidade celular foram obtidos através de ensaios preliminares realizados no laboratório.

Este experimento foi baseado no protocolo descrito primeiramente por W. Kueng et al., 1989.

7.5 Quantificação do processo autofágico por Laranja de Acridina

As células foram plaqueadas em placas p96 na densidade de 4×10^3 células/poço em 200 μ L por poço. Após 24 horas para que ocorresse a adesão celular, as células foram tratadas em quintuplicatas nas condições: controle (DMEM 10% SBF), DMSO 100 μ M, TMZ 100 μ M e DMEM A.G. sem SBF, por um período de 72 horas. Em seguida, foram adicionados 2 μ L de solução de laranja de acridina (AO) (1 μ g/mL) por poço e, após 15 minutos, foi possível observar a presença de vesículas ácidas através do microscópio de luz invertida de fluorescência (Zeiss Axiovert). Este

experimento foi baseado no protocolo descrito pelo grupo de pesquisa do professor Guido Lenz, disponível em: <http://www.ufrgs.br/labsinal/protocols/autofagy.html>.

7.6 Avaliação da expressão de RECKA e RECKB

7.6.1 Extração de RNA total

As células foram plaqueadas em cultura aderente na densidade de 7×10^5 células por placa de 100mm^3 e após os diferentes tratamentos foram desaderidas por adição de tripsina e submetidas à centrifugação de 1000 rcf por 3 minutos, descartando seu sobrenadante e o pellet congelado. O RNA total dos *pellets* foi isolado utilizando o kit GE Healthcare- ilustra RNA spin Mini RNA isolation, seguindo as instruções do fabricante. O RNA isolado foi então quantificado no Nanodrop 2000 (Thermo).

7.7 Avaliação da expressão proteica

7.7.1 Extração e quantificação de proteínas

As células foram plaqueadas em cultura aderente na densidade de 7×10^5 células por placa de 100mm^3 em DMEM A.G. com 10% SBF por 24 horas para que ocorra a adesão celular. Em seguida, as placas foram lavadas com PBS 1X para retirada de resíduos metabólicos e foram submetidas aos tratamentos: controle (DMEM A.G. 10% SBF), DMSO 100 μM , TMZ100 μM e DMEM A.G. sem SBF, por um período de 72 horas.

Em seguida, o meio DMEM A.G. foi retirado, as células foram lavadas em PBS 1X resfriado e submetidas à tripsinação para desaderência e inseridas em um tubo falcon sob gelo. Este tubo foi centrifugado à 1000g por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado e ressuspenso em 100 μL de tampão RIPA+ (10mM Tris-HCl pH7,5, 150mM NaCl, desoxicolato de sódio 1%, Triton X-100 1%, SDS 0,1%, 1Mm PMSF, 1mM Na₃VO₄, 1mM β -glicerofosfato, 2,5mM Na₃P₂O₇) e 1 μL de PMSF em cada amostra e submetidas ao vórtex vigorosamente por 10 vezes. O lisado foi transferido para um tubo de 1,5mL e colocado imediatamente à 4°C por um período de 45 minutos, sendo que a cada 15 minutos era submetido novamente ao vórtex.

Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 15000g, por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante foi retirado e realocado em tubos novos, mantidos sob refrigeração. A quantificação das proteínas totais foi realizada imediatamente após a extração pelo método de Bradford (Comassie brilliant blue G-250, etanol 95% e ácido fosfórico 85%), (BRADFORD, M.M.; 1976), utilizando para a curva BSA 2mg/mL e água ultrapura (Tabela 2). E em seguida, as amostras foram armazenadas à -80°C.

Tabela 2. Curva padrão de Bradford

Pontos	0	0,4	0,8	1,2	1,6	2,0
	(branco)	mg/mL	mg/mL	mg/mL	mg/mL	mg/mL
Água ultrapura	5 µL	4 µL	3 µL	2 µL	1 µL	0 µL
BSA	0 µL	1 µL	2 µL	3 µL	4 µL	5 µL

A curva acima, gerou o seguinte gráfico com valores de regressão linear:

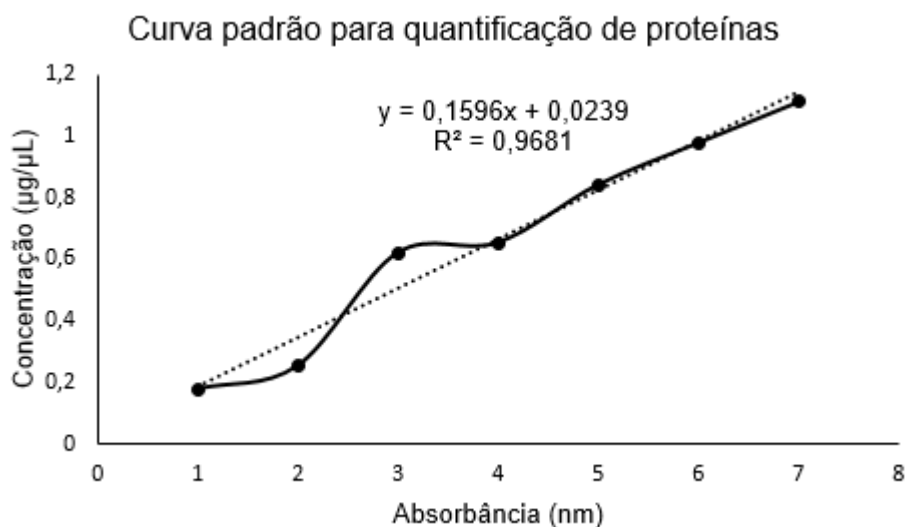


Figura 13. Curva padrão para quantificação de proteínas

A partir dos valores de $a=0,1596$ e $b=0,0239$, foi realizada a razão entre o valor obtido de cada amostra e o valor de “a”, subtraindo o valor de “b”, obtendo assim a quantificação total das proteínas extraídas. Para uma concentração final de 50 µg de proteína por poço, os valores foram padronizados para cada condição, que continha o valor fixo de 10 µL de tampão de amostra (supracitado) e o volume faltante para completar 30 µL de amostra, de tampão RIPA+ (supracitado).

7.7.2 Imunodetecção de proteínas

Foram utilizadas alíquotas de 50 µg de proteína, 10 µL de tampão de amostra 3X (Tris-HCl (pH 6,8) 150 mM, SDS 6%, glicerol 30%, β-mercaptoetanol 15% e azul de bromofenol 0,3%) e o restante para completar um volume final de 30 µL, foi utilizado tampão RIPA+ (composição subescrita) para eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS PAGE nas concentrações de 10%-12%, utilizando em média voltagem de 90V por 2 horas. Também foi utilizado gel de poliacrilamida 12% presente no kit GE Healthcare Amersham™ ELC™ Gel BOX, seguindo as instruções do fabricante. Como padrão de peso molecular, foi utilizado 5 µL do Spectra Multicolor Hight Range Protein Ladder (Thermo Scientific). Após este processo, as proteínas do gel de poliacrilamida foram transferidas para uma membrana de PVDF utilizando transferência úmida e semi-seca. A coloração de Ponceau foi utilizada para visualizar a transferência para a membrana e o corante azul de bromofenol foi utilizado para a coloração do gel. A detecção das proteínas foi realizada a partir da incubação por 4 horas dos anticorpos primários, especificamente: Anti-LC3-I/II e Anti-GAPDH) e por 2 horas dos anticorpos secundários Anti-rabbit e anti-mouse, respectivamente, diluídos conforme instruções do fabricante. Para a revelação, a membrana foi incubada com o substrato quimioluminescente Supersignal® West Pico (Stable Peroxide Solution e Luminol/Enhancer Solution – Thermo Scientific) na proporção de 1:1 durante 1min, em temperatura ambiente. O excesso de substrato foi retirado, e a membrana posicionada no fotodocumentador Amersham® imager 600 – GE Healthcare Life Sciences por 45 segundos.

7.8 Análise estatística

As análises estatísticas serão realizadas no software GraphPad Prism 5.00 (GraphPad Software, San Diego, CA). Para a comparação entre os valores experimentais obtidos entre o controle e as condições de tratamento, será realizado o teste ANOVA com teste de Tukey. Valores de *p* menores que 0,05 serão considerados estatisticamente significativos.

7.9 Análises de Bioinformática

As análises de bioinformática serão realizadas através de análises de expressão gênica, correlacionando a expressão de RECKA e RECKB com Notch1 através de dados gerais de pacientes com GBM presentes no TCGA (The Cancer Genome Atlas) e através de estudos de localização e associação de SNPs de RECK e Notch1 que possuem associação com fenótipos de agressividade para outros tipos de tumores, que não GBM, através de dados presentes na plataforma Ensembl.

8. RESULTADOS E DISCUSSÃO

8.1 Responsividade celular à TMZ e correlação com o processo autofágico

A responsividade à TMZ das diferentes linhagens de glioblastoma humano com superexpressão de RECKA e RECKB foi avaliada após 72h de tratamento utilizando marcação das células consideradas viáveis (células na condição aderida) com Cristal Violeta.

A Figura 6 mostra o resultado obtido. É possível observar que a linhagem parental U87MG apresentou diminuição do número de células após o tratamento com TMZ em torno de 63%. De maneira inesperada, a linhagem controle, infectada apenas com o vetor vazio, U87MG–EGFP, apresentou maior número de células frente à administração de TMZ se comparada com a linhagem parental (em torno de 85%). A linhagem que superexpressa RECKA (U87MG-RECKA) apresentou uma responsividade à TMZ similar as células parentais (atingindo 73% de viabilidade), porém, de maneira interessante, ambas as linhagens demonstram maior sensibilidade à droga, devido à redução no número de células, em comparação com a linhagem que superexpressa RECKB (a qual não apresenta efeito citotóxico significativo mediante o tratamento com TMZ).

Vale destacar que esse resultado se correlaciona com dados prévios da literatura, os quais Trombetta-Lima e colaboradores, observaram maior potencial de formação de colônias em agarose em células que superexpressam RECKB se comparado com as demais linhagens. Além disso, também foram realizadas análises

que correlacionaram a expressão de RECKA e RECKB com a taxa de sobrevivência de pacientes com GBM, sendo que os pacientes que apresentam maior expressão de RECKB possuem redução na taxa de sobrevivência se comparado com pacientes que apresentam maior expressão de RECKA (TROMBETTA-LIMA et al., 2015). Estes resultados prévios demonstram a associação da expressão de RECKB com maior agressividade tumoral. De modo interessante, nossos resultados sugerem que RECKB pode colaborar para a maior resistência ao tratamento com TMZ.

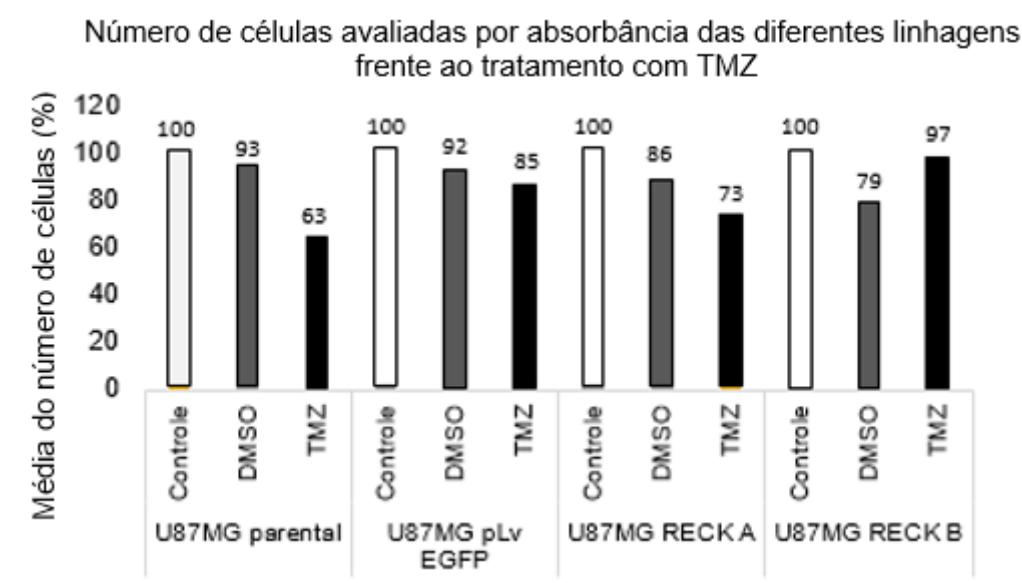


Figura 6. Células U87MG, U87MG-EGFP, U87MG-RECKA, U87MG-RECKB foram plaqueadas, tratadas com TMZ (100 μ M) por 72h e o número de células (% de células aderentes) foi avaliada por marcação de cristal violeta. Como controles foram utilizadas células mantidas apenas com DMEM A.G enriquecidas com 10% SBF e DMSO 0,1 % (veículo da TMZ). Os dados representam 2 experimentos realizados em quintuplicatas e as médias dos controles foram considerados 100%.

NOTA: Os testes estatísticos de Anova e Tukey serão realizados futuramente, quando o número de replicatas for mais significativo, resultando em uma estatística mais confiável.

Concomitantemente com o ensaio de cristal violeta para avaliar viabilidade, foi realizado um plaqueamento com a mesma densidade celular e tempo de tratamento e as células foram coradas com Laranja de acridina (AO) para marcar a presença de vesículas ácidas após as 72 h.

A figura 7 mostra os resultados obtidos para a coloração por laranja de acridina frente ao tratamento com TMZ por 72h. A linhagem parental U87MG, assim como a linhagem U87MG-EGFP infectada com o vetor vazio, mostraram elevada marcação por AO apenas sob o tratamento com TMZ, o que corrobora com os dados da literatura supracitados. A linhagem que superexpressa RECKA mostrou marcação por AO já na condição controle de DMSO e parece manter o nível de marcação com AO após TMZ.

Porém, de maneira interessante, a linhagem U87MG-RECKB responde de maneira muito mais intensa à tal marcação do que as demais linhagens, tendo um expressivo aumento na marcação com AO após o tratamento com TMZ. É interessante notar que a linhagem U87MG-RECKB não apresenta diminuição de viabilidade celular após exposição à TMZ (Figura 6), mantendo valores de viabilidade próximas ao controle.

Em conjunto, nossos dados sugerem que a autofagia induzida pelo tratamento com TMZ possa estar ligada à mecanismos protetivos de resistência da célula à administração da droga, em especial na linhagem U87MG-RECKB. Vale ressaltar que a linhagem parental U87MG apresentou elevada marcação por AO após tratamento com TMZ, e apresentam redução de viabilidade, demonstrando sensibilização, o que corrobora com os resultados obtidos por Natsumeda e colaboradores em 2011, que a partir de análises de GBM de paciente mostram que a viabilidade celular reduzida decorrente do tratamento com TMZ é resultante do processo de indução autofágica - como mecanismo de defesa- e não somente do processo apoptótico como era anteriormente descrito (NATSUMEDA et al., 2011). Como sugerido no artigo anterior e, de maneira interessante, publicado pelo mesmo grupo cinco anos mais tarde, a utilização de cloroquina como inibidor do processo autofágico anterior ao tratamento com TMZ, promove uma redução na viabilidade e citotoxicidade do tratamento, mostrando que a autofagia atua como um mecanismo protetor de morte em GBM e ainda, que este processo é dependente da inibição da via de sinalização de Notch1 (NATSUMEDA et al., 2016). Neste contexto, a linhagem U87MG-RECKB demonstra maiores marcações por AO e não responde ao tratamento com TMZ, diferindo em apenas 3 pontos percentuais em relação ao controle da mesma linhagem, sugerindo que esta linhagem utilize do processo autofágico como um mecanismo protetivo de sobrevivência.

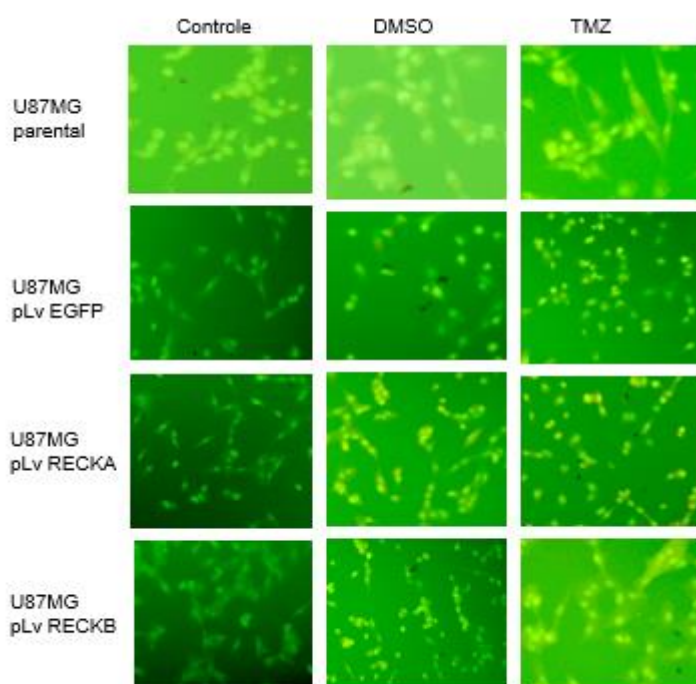


Figura 7. Células U87MG, U87MG-EGFP, U87MG-RECKA, U87MG-RECKB foram plaqueadas, tratadas com TMZ (100 μ M) por 72h e a presença de vesículas ácidas, sugerindo indução autofágica foi avaliada por marcação de laranja de acridina. Como controles foram utilizadas células mantidas apenas com DMEM A.G enriquecidas com 10% SBF e DMSO 0,1% (veículo da TMZ). Os dados representam um experimento realizado em quintuplicatas.

8.2 Responsividade celular à privação de nutrientes e correlação com o processo autofágico

Para avaliar se a privação de nutrientes modularia o processo autofágico de maneira distinta dependente da expressão das isoformas de RECK, as diferentes células foram plaqueadas, submetidas ao carenciamento de SBF por 72 horas. Como controle foram utilizadas células que tiveram a suplementação com 10% de SBF mantidas ao longo deste período.

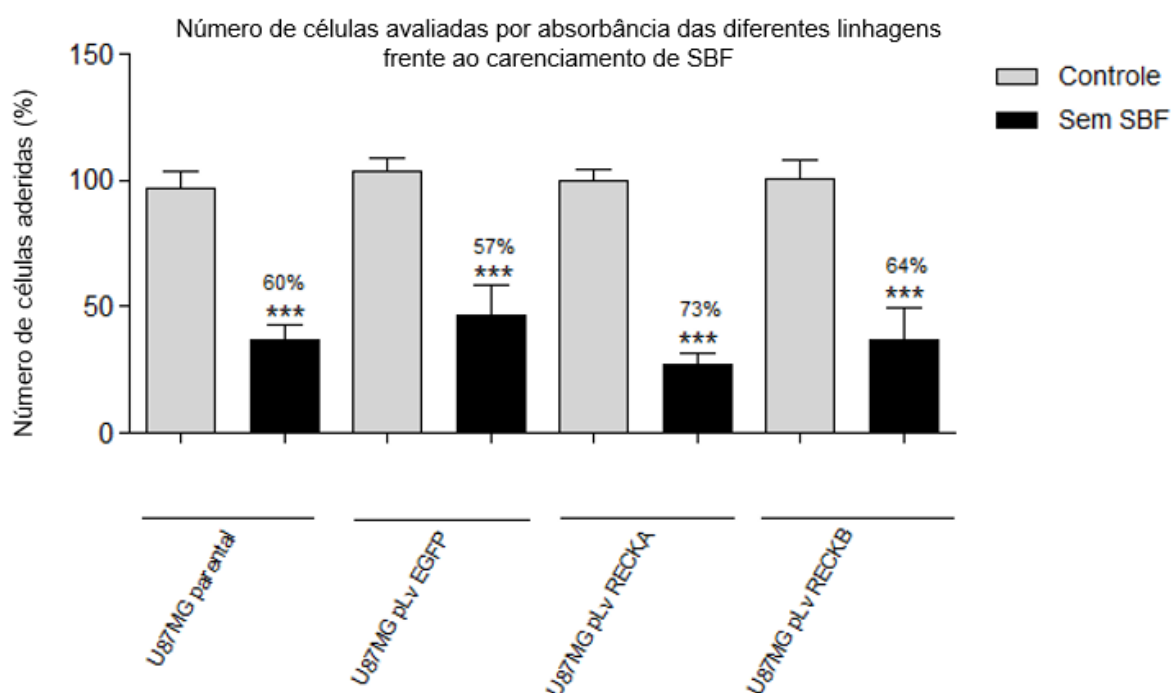


Figura 8. Células U87MG, U87MG-EGFP, U87MG-RECKA, U87MG-RECKB foram plaqueadas e submetidas ao carenciamento total de soro bovino fetal por 72h. O número de células (% de células aderentes) foi avaliada por marcação de cristal violeta. Como controles foram utilizadas células mantidas apenas com DMEM A.G enriquecidas com 10% SBF. Os dados representam 2 experimentos realizados em quintuplicatas. Foi utilizado o teste estatístico ANOVA, com $p > 0,05$ considerado significativo.

Na figura 8 é possível observar que todas as linhagens apresentaram redução significativa no número de células aderidas frente ao carenciamento de SBF. As linhagens U87MG parental (redução de 60% do número de células submetidas ao carenciamento se comparadas ao controle), U87MG-EGFP (redução de 57% do número de células nas mesmas condições supracitadas) e a linhagem U87MG-RECKB (redução de 64%) obtiveram reduções no número de células frente ao carenciamento, de maneira similar. Porém, de maneira interessante, a linhagem que superexpressa RECKA apresentou uma tendência à maior sensibilidade ao carenciamento por soro, atingindo o maior percentual do número de células aderidas frente ao carenciamento, se comparada ao seu controle (aproximadamente 73%). Estes resultados não mostraram diferença estatística significativa entre as linhagens. Para melhor análise, serão realizados novos ensaios.

Na sequência, a avaliação de vesículas ácidas foi realizada nas diferentes linhagens submetidas ao carenciamento. Na figura 9 observa-se que a marcação por AO em resposta ao carenciamento de SBF foi significativamente maior para todas as linhagens se comparada aos respectivos grupos controles. De forma interessante, a linhagem U87MG-RECKA mesmo apresentando elevada marcação por AO, apresenta uma tendência de exibir uma maior redução no número de células após o carenciamento, sugerindo que estas células estão em processo de morte celular, porém de maneira independente da indução do processo autofágico. Também foi observado, que a linhagem U87MG-RECKB apresenta maior número de células após carenciamento em comparação com a linhagem U87MG-RECKA, mas apresenta percentual de número de células similares à linhagem U87MG parental (diferindo em 4 pontos percentuais a mais para a primeira linhagem se comparada com a segunda) e de maneira inesperada, a linhagem U87MG pLv EGFP apresentou os maiores percentuais do número de células (57%).

A elevada marcação por AO na linhagem U87MG-RECKB, sugerindo que o processo autofágico nestas células está atuando como mecanismo de sobrevivência celular. Na imagem da figura 9, não é possível observar tal intensidade, pois as fotografias ficaram comprometidas, provavelmente devido à problemas nas lentes internas do equipamento. Por este motivo, serão realizados novos ensaios de marcação por AO utilizando outras metodologias, como por exemplo, citometria de fluxo, para comprovar, de maneira quantitativa, os resultados obtidos.

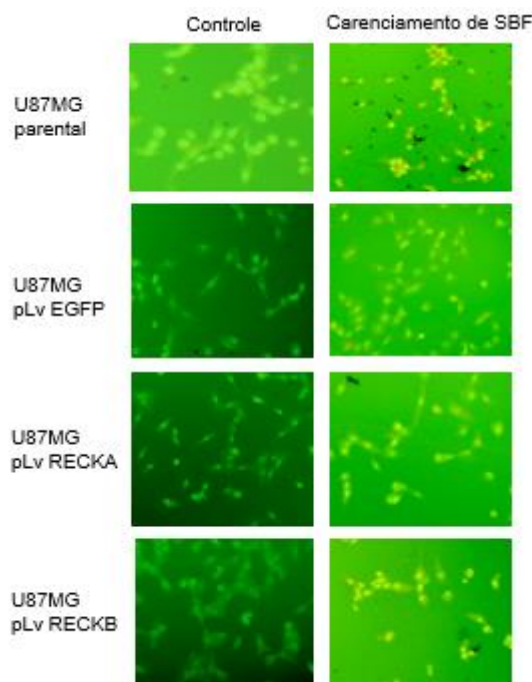


Figura 9. Células U87MG, U87MG-EGFP, U87MG-RECKA, U87MG-RECKB foram plaqueadas e submetidas ao carenciamento total de soro bovino fetal. A presença de vesículas ácidas, sugerindo indução autofágica foi avaliada por marcação de laranja de acridina. Como controles foram utilizadas células mantidas apenas com DMEM A.G enriquecidas com 10% SBF.

8.4 *Hanging drops*

A partir de metodologia já padronizada em nosso laboratório para formação e manutenção de esferoides derivados de linhagens de glioblastoma humano, foi utilizada a técnica de *hanging drops* para as quatro linhagens estudadas. Nesse protocolo as células são mantidas em cultivo em gota por 72h e na sequência mantidas em substrato não aderente polyhema por 5 dias. Uma figura representativa dos esferoides formados pode ser visualizado na Figura 10.

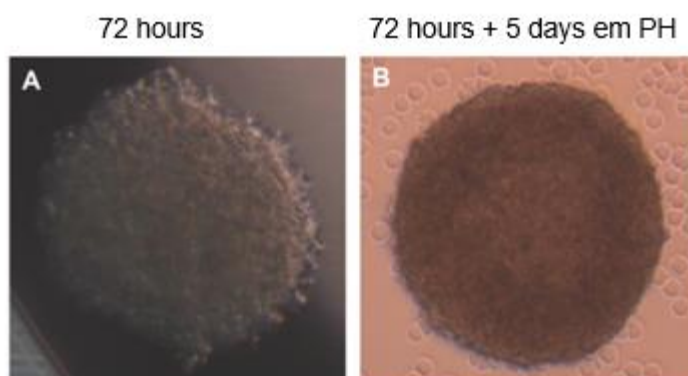


Figura 10. A. Formação de esferoides em hanging drop por 72 h. B. Manutenção do esferoide por 5 dias em p100 recoberta de Poly-HEMA 1.2% para a linhagem U87MG parental.

Os esferoides foram obtidos após plaqueadas 200 gotas para cada linhagem (U87MG parental, U87MG EGFP, U87MG RECKA e U87MG RECKB), contendo 25 μ L de meio DMEM A.G. 10% SBF e 1×10^3 células por gota. Estas células permaneceram em *hanging drop* por 72 horas e em seguida, cada linhagem foi dividida em duas placas p100 recobertas de poly-HEMA, com aproximadamente 100 gotas para cada condição: DMEM A.G 10% SBF e DMEM A.G sem soro bovino fetal, permanecendo nessa condição por 5 dias. Em seguida foram feitas análises morfológicas dos esferoides e, após dissociação dos mesmos, marcação por laranja de acridina.

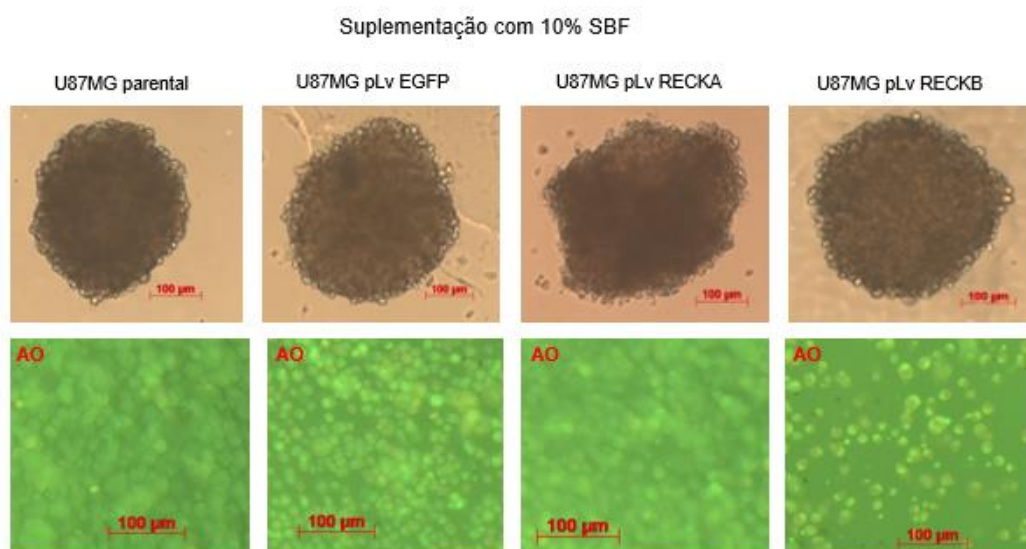


Figura 11. Manutenção dos *hanging drops* por 5 dias em poly-HEMA com suplementação de 10% de SBF. Dissociação dos esferoides e marcação com laranja de acridina (AO).

É possível observar que todas as linhagens utilizadas foram capazes de formar esferoides após 72hr em *hanging drops* e a manutenção desses esferoides por 5 dias em poly-HEMA com a suplementação de 10% de SBF junto ao meio de cultura, ocorreu com bordas lineares, não diferenciando muito da linhagem parental para qual a técnica já havia sido padronizada. O número de esferoides a partir de observação foi bastante semelhante. O tamanho médio dos esferoides também foi bastante similar entre as diferentes linhagens, atingindo em torno de 250 μ M.

Em relação a marcação por AO percebe-se a presença de algumas vesículas ácidas na linhagem controle U87MG-EGFP em relação a células parental U87MG, entretanto, para a linhagem U87MG-RECKB essa marcação tornou-se muito mais

evidente (Figura 11, painel inferior). Esses resultados corroboram nossos resultados prévios, fortalecendo a ideia de que a linhagem U87MG-RECKB possui a ativação da autofagia.

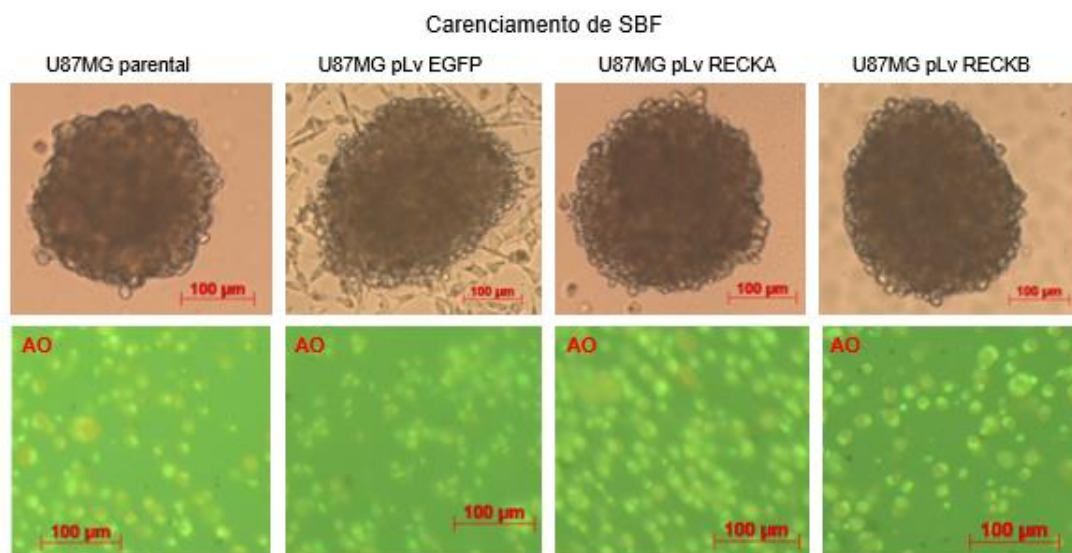


Figura 12. Manutenção dos *hanging drops* por 5 dias em poly-HEMA em meio carenciado de SBF. Dissociação dos esferoides e marcação com laranja de acridina (AO).

Na sequência, o efeito do carenciamento por soro foi avaliado nos esferoides formados a partir das diferentes linhagens.

A figura 12 mostra os resultados obtidos. De maneira interessante, o carenciamento de SBF durante a manutenção em poly-HEMA promoveu uma redução no número de esferoides (por análises observacionais) e no tamanho dos esferoides formados (em média em 50 µm em relação aos grupos controle), além de haver elevada marcação por laranja de acridina (Figura 12, painel inferior), indicando possivelmente que essas células estão entrando em processo de autofagia como um mecanismo de compensação pela deprivação nutricional que estão sofrendo. Neste caso, é possível sugerir que o carenciamento de soro induz um processo autofágico que não é tão evidente apenas para a linhagem U87MG-RECKB, mas para as demais linhagens, demonstrando que ele supera a diferença observada para o tratamento com TMZ.

8.5 Avaliação da expressão gênica

Tendo em vista que os resultados anteriores fenotípicos mostraram uma possível associação entre a superexpressão de RECKB e o processo autofágico, nós buscamos avaliar a expressão de marcadores clássicos de autofagia: LC3 I/II e p62.

8.5.1 Análise da expressão dos marcadores de autofagia

Após obtidos os extratos proteicos das várias linhagens submetidas aos diferentes tratamentos, as amostras foram quantificadas utilizando reagente de Bradford (Tabela 3).

Tabela 3. Valor total da concentração proteínas extraídas

QUANTIFICAÇÃO TOTAL DE PROTEÍNAS $\mu\text{g}/\mu\text{L}$			
Linhagem	Controle	DMSO	TMZ
U87MG parental	6,5	6,7	5,7
U87MG-EGFR	5,4	5,5	5,1
U87MG-RECKA	6,2	5,4	5,6
U87MG- RECK B	5,8	5,8	5,9

NOTA: não obtivemos extração de proteínas para a condição sem SBF devido à contaminação bacteriana.

As amostras de proteínas foram submetidas a eletroforese SDS-Page e Western-blotting utilizando anticorpos específicos para LC3I/II e GAPDH. Primeiramente, foram realizadas 2 corridas utilizando gel pronto de poliacrilamida 12% e transferência semi-seca. Após as corridas o gel foi corado com azul de bromofenol e a membrana foi corada com solução de Ponceau (0,1% Ponceau e 0,5% de Ácido acético), observando marcação apenas no gel. O que indica que possivelmente tenha ocorrido falha na transferência do gel para a membrana. Desta maneira, foram realizadas outras 3 corridas utilizando gel preparado manualmente nas mesmas concentrações e foi utilizado o método de transferência úmida. Assim como supracitado, o gel e a membrana foram corados e observou-se a marcação de bandas pela coloração de Ponceau, indicando que a transferência foi efetiva, embora não tenha sido possível observar marcação com o anticorpo anti-LC3I/II e com o anti-GAPDH, sugerindo que possivelmente haja falha na funcionalidade dos anticorpos. Desta maneira, serão realizadas novas corridas e incubações com um novo anticorpo anti-LC3I/II e nova diluição para anti-GAPDH.

8.5.2 Análise de expressão de mRNA

Após a extração de RNA realizada pelo kit supracitado foi obtido um volume final de 40 μL por amostra. Estas amostras foram quantificadas no equipamento Nanodrop, conforme instruções do fabricante, gerando as seguintes quantificações:

Tabela 4. Quantificação de RNA utilizando Nanodrop

Quantificação de RNA				
Linhagem	Controle	DMSO	TMZ	Sem SBF
U87mg validada parental	6,8 ng/ μL	5,5 ng/ μL	8,8 ng/ μL	1,4 ng/ μL
U87mg validada pLv EGFR	4,4 ng/ μL	7,6 ng/ μL	2,4 ng/ μL	2,5 ng/ μL
U87mg validada pLv RECKA	5,1 ng/ μL	13,9 ng/ μL	10,6 ng/ μL	8,6 ng/ μL
U87mg validada pLv RECK B	6,8 ng/ μL	5,0 ng/ μL	4,2 ng/ μL	6,0 ng/ μL

Embora as amostras tenham gerado quantidades baixas de RNA para dar sequência à síntese de cDNA e posteriormente à q-PCR, utilizando primers para LC3-I e II e P62, devido ao baixo número de células utilizados para a extração. Foi realizado uma corrida em gel de agarose 1.2% utilizando 10 μL de cada amostra dos valores negritados na tabela acima (controle RECKA, controle RECKB, RECKA sem soro e RECKB sem soro) e 2 μL de solução de azul de bromofenol, xileno e glicerol, incubada em brometo de etídeo e revelada em câmara de luz UV. Verificou-se que apenas quando a imagem era altamente contrastada, era possível observar a presença de uma banda na parte superior do gel em cada uma das amostras testadas, sugerindo possível contaminação por DNA. Desta maneira, será realizada uma nova extração de RNA, utilizando maior densidade celular e utilizando inibidor de RNase na coluna de eluição da amostra, para se obter maior qualidade na extração de RNAs.

8.6 Análises de bioinformática

8.6.1 Análise da expressão de RECK e Notch1 em pacientes com GBM a partir de amostragem de dados do TCGA

Com o auxílio do mestrando Henrique Taborda Ribas, foram analisadas 160 amostras de RNA-seq de pacientes com GBM, presentes no TCGA (dados retirados

do link < <http://firebrowse.org/>>) e correlacionadas com a expressão de Notch1 (Figura 14) através de ferramentas de programação em python. Para ambas as isoformas de RECK, sendo RECKB o primeiro gráfico e RECKA o segundo gráfico, não obtivemos correlação significativa. Como perspectiva futura, iremos avaliar somente dados de pacientes que possuem fenótipo de maior agressividade tumoral, bem como a razão entre a expressão de RECK-A e RECK-B.

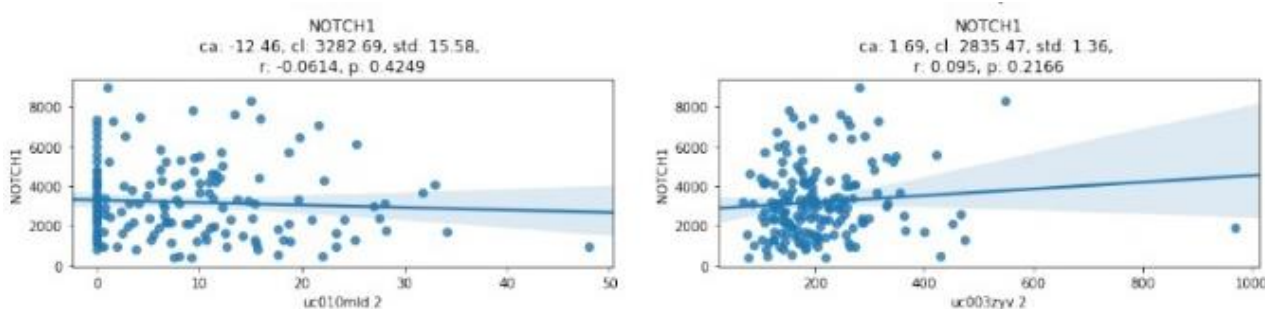


Figura 14. Correlação da expressão de RECKB (primeiro gráfico) e RECKA (segundo gráfico) com a expressão de Notch1.

8.6.2 Análise da expressão de SNPs de RECK e Notch1

Uma outra abordagem realizada foi através da associação de SNPs (polimorfismos de nucleotídeo único) de RECK e Notch1, ambos correlacionados com fenótipos de agressividade em Ameloblastoma (ZHANG et al., 2017) e Carcinoma de mama ductal invasivo (CAO et al., 2014), respectivamente, através dos dados presentes na plataforma Ensembl.

Para o gene RECK foi selecionado o SNP rs16932912, localizado na região 36087879pb do cromossomo 9, tratando-se de uma variável missense G/A e o valor de PolyPhen (Prediction of functional effects of human nsSNPs – Trata-se de uma ferramenta que prevê o possível impacto de uma substituição de aminoácidos na estrutura e função de uma proteína humana usando considerações físicas e comparativas diretas) de 0,103, considerado benigno, significando que afeta positivamente funções físicas e comparativas da proteína codificada pelo transcrito. Além disso, existem dados da presença deste SNP em diferentes tecidos, incluindo regiões do SNC, como hemisfério cerebelar e hipotálamo. Infelizmente, ainda não existem dados referentes as isoformas alternativas de RECK. Através de análises filogenéticas, do total de 70 espécies analisadas, 54 não apresentaram variações da

sequência (equivalente a 77%), a hipótese evolutiva para a alta taxa de conservação seja de que ela esteja atrelada a função de proteção dos organismos ao desenvolvimento e manutenção de tumores, por se tratar de um gene supressor de tumor (RECK na forma canônica), sendo um fator evolutivamente benéfico.

Para o gene Notch1 foi selecionado o SNP rs3124591, localizado na região 136495945pb também do cromossomo 9, tratando-se de uma região prime 3'UTR T/C. Ainda não existem valores de PolyPhen para este SNP. Da mesma forma que o SNP de RECK, este SNP também está presente em diferentes tecidos do SNC, como córtex do giro anterior do cíngulo, gânglio do núcleo caudado, hemisfério cerebelar e córtex cerebral. Foram realizadas as mesmas análises filogenéticas realizadas para o SNP de RECK, mostrando a conservação da sequência de interesse em 74% das espécies, apresentando também alta taxa conservativa.

Quando realizadas análises de desequilíbrio de ligação entre estes dois SNPs (Figura 15), encontramos uma possível correlação para a amostragem da população de Serra Leoa (África) (dados presentes no Ensembl retirados do projeto 1000 Genomes), tendo um valor de D' ($D'=D/D_{max}$, sendo D a diferença entre as frequências haplotípicas observadas e esperadas baseadas na frequência dos alelos se eles se segregassem de maneira independente), foi igual a 0,33, o que indica pouco desequilíbrio de ligação e presença de fatores de recombinação. O valor de R^2 (trata-se de uma correlação que reflete as frequências alélicas) também foi igual a 0,05, sendo que somente valores de R^2 acima de 0,8, já são considerados de alta correlação. Este resultado indica que os SNPs estão em desequilíbrio de ligação, embora não seja tão alto se comparado com outros SNPs, na população de Serra Leoa, de maneira interessante, não existe nenhum resultado publicado acerca desta análise. Como perspectivas futuras, serão avaliadas a presença destes SNPs correlacionado com resultados clínicos de pacientes no TCGA.

Population	Description	Focus Variant	Variant 2	Variant 2 Location	r^2	D'
1000GENOMES:phase_3.MSL	Mende in Sierra Leone	rs16932912	rs3124591	9.136495945	0.058796	0.330573

Figura 15. Desequilíbrio de ligação entre os SNPs rs16932912 e rs3124591 para a população de Serra Leoa.

Os valores de D' encontrados para ambos os SNPs, estão representados na figura 16 em chamados “blocos quentes de recombinação”, significando que a análise de apenas um SNP presente em um bloco é representativo para a análise dos demais

SNPs daquele mesmo bloco, simplificando a análise de dados presentes em genética de populações humanas. Futuramente, busca-se sobrepor estes dois gráficos, de forma a obter possíveis SNPs comuns para ambos os genes.

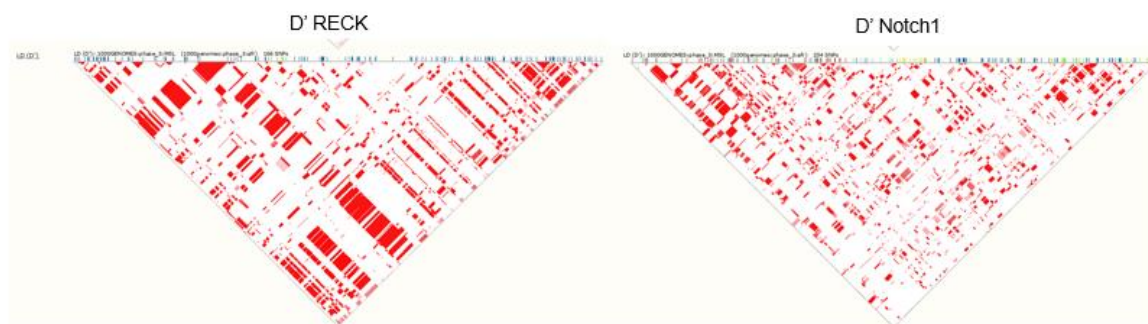


Figura 16. Representação gráfica de conjunto de D' para os SNPs selecionados dos genes RECK e Notch1, mostrando os “pontos quentes de recombinação” de diferentes SNPs, com o SNP analisado. Estes dados foram extraídos da plataforma Ensembl.

9. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Com o desenvolvimento deste trabalho é possível concluir que, de forma interessante, a linhagem U87MG-RECKB possui de fato uma tendência de resistência ao tratamento de TMZ e parece responder de forma distinta ao carenciamento por soro comparativamente com as outras linhagens. Ainda, essa linhagem apresenta uma marcação mais intensa de AO, em comparação com as outras linhagens avaliadas, em resposta a todas as condições utilizadas nesse estudo: resposta à TMZ, carenciamento por soro, cultivo em neuroesfera. Em conjunto, esses resultados sugerem que índices autofágicos elevados encontrados na linhagem U87MG RECK-B possam promover um mecanismo de sobrevivência celular frente as diferentes condições de estresse celular avaliadas nesse estudo. O que complementa o trabalho descrito por Trombetta-Lima e colaboradores em 2015, que descreve a U87MG RECK-B como uma linhagem mais agressiva.

Já a linhagem U87MG RECK-A não apresentou responsividade diferencial em resposta à TMZ quando comparada as células controle, porém quando essas células foram carenciadas para soro obteve-se uma menor tendência de redução no número de células, mas quando submetido ao teste estatístico anova, essa diferença não se mostrou significativa. De forma interessante, esta linhagem apresentou-se de maneira

distinta à linhagem U87MG RECK-B, possuindo um menor índice de marcação por laranja de acridina, mostrando que a responsividade de U87MG RECK-A ao processo autofágico ocorre de maneira distinta da linhagem U87MG RECK-B.

Além disso, obtivemos a formação de esferoides lineares a partir de todas as linhagens utilizadas nesse estudo e comparativamente, o carenciamento de SBF durante este período promoveu redução no tamanho e número de esferoides formados e elevada marcação por laranja de acridina.

Como perspectivas futuras, busca-se repetir as extrações proteicas e realizar novos ensaios de Western blot, realizar novas extrações de RNA para dar sequência ao ensaio de q-PCR e realizar novas repetições dos testes de cristal violeta e marcação por laranja de acridina, para aumentar o número amostral e propiciar análises estatísticas mais confiáveis e de melhor visualização de imagens, analisar novamente os resultados obtidos no TCGA, filtrando as amostras de GBM de acordo com o grau de agressividade e a razão entre as expressões de RECK-A e RECK-B, e analisar, de maneira comparativa, a expressão das isoformas de RECK juntamente com outros genes importantes para o contexto tumoral, como Notch1 e o ligante de Notch1, Hes.

10. REFERÊNCIAS

- ACS (American Cancer Society). Survival Rates for Selected Adult Brain and Spinal Cord Tumors, 2017.
- BARTH, J. M. I.; KÖHLER, K. How to take autophagy and endocytosis up a notch. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.
- BERENS, E. B. et al. A Cancer Cell Spheroid Assay to Assess Invasion in a 3D Setting. **Journal of Visualized Experiments**, n. 105, p. 1–6, 2015.
- BERGERS, G. et al. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. v. 2, n. 10, p. 737–744, 2010.
- BLACKBURN, D. et al. Astrocyte function and role in motor neuron disease: A future therapeutic target? **Glia**, v. 57, n. 12, p. 1251–1264, 2009.
- CAO, Y. et al. Notch1 single nucleotide polymorphism rs3124591 is associated with the risk of development of invasive ductal breast carcinoma in a Chinese population. v. 7, n. 7, p. 4286–4294, 2014.
- COHEN, A. L.; HOLMEN, S. L.; COLMAN, H. IDH1 and IDH2 Mutations in Gliomas. p. 1–7, 2013.
- DUNLOP, E. A.; TEE, A. R. mTOR and autophagy: A dynamic relationship governed by nutrients and energy. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, p. 1–9, 2014.
- ESTIMATIVA, I. **Incidência de Câncer no Brasil**. Instituto Nacional José de Alencar Gomes da Silva (INCA), 2017.
- EVA MARIA GALAN-MOYA, LUCAS TREPS, LISA OLIVER, HERVÁ CHNEIWEISS, FRANÇOIS M. VALLETE, NICOLAS BIDÈRE, J. G. Endothelial Secreted Factors Suppress Mitogen Deprivation-Induced Autophagy and Apoptosis in. v. 9, n. 3, p. 1–8, 2014.
- FILIPPI-CHIELA, E. C. et al. Single-cell analysis challenges the connection between autophagy and senescence induced by DNA damage Single-cell analysis challenges the connection between autophagy and senescence induced by DNA damage. v. 8627, n. October, p. 1099–1113, 2016.
- FUKAI, J.; KOIZUMI, F.; NAKAO, N. Enhanced Anti-Tumor Effect of Zoledronic Acid Combined with Temozolomide against Human Malignant Glioma Cell Expressing O 6 - Methylguanine DNA Methyltransferase. v. 9, n. 8, p. 1–13, 2014.
- HALES, E. C.; TAUB, J. W.; MATHERLY, L. H. New insights into Notch1 regulation of the PI3K-AKT-mTOR1 signaling axis: Targeted therapy of γ -secretase inhibitor resistant T-cell acute lymphoblastic leukemia. **Cellular Signalling**, v. 26, n. 1, p. 149–161, 2014.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HONG, K. J. et al. RECK Inhibits Stemness Gene Expression and Tumorigenicity of Gastric Cancer Cells by Suppressing ADAM-Mediated Notch1 Activation. **Journal of Cellular Physiology**, v. 229, n. 2, p. 191–201, 2014.

INTERNATIONAL, T. et al. Descriptive epidemiology of brain and central nervous system cancers in Central and South America \$. **Cancer Epidemiology**, v. 44, p. S141–S149, 2016.

JACOMASSO, T.; WINNISCHOFER, S.M.B. O papel do gene RECK como marcador tumoral de melanoma- função e regulação dos transcritos RECKA e RECKB. Tese de doutorado apresentado à Universidade Federal do Paraná, 2014.

JAWHARI, S.; VERDIER, M.; DEATH, C. Glioblastoma , hypoxia and autophagy : a survival-prone “ ménage-à-trois ”. p. 1–10, 2016.

JIANG, H. et al. **Autophagy Pathways in Glioblastoma**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2009. v. 453

JIANG, P. et al. Novel anti-glioblastoma agents and therapeutic combinations identified from a collection of FDA approved drugs. p. 1–13, 2014.

KANAMORI, M. et al. Contribution of Notch signaling activation to human glioblastoma multiforme. **Journal of Neurosurgery**, v. 106, n. 3, p. 417–427, 2007.

LEDUR, P. F. et al. Culture conditions defining glioblastoma cells behavior: what is the impact for novel discoveries? **Oncotarget**, v. 8, n. 40, p. 69185–69197, 2017.

LEFRANC, F.; FACCHINI, V.; KISS, R. Proautophagic Drugs: A Novel Means to Combat Apoptosis-Resistant Cancers, with a Special Emphasis on Glioblastomas. **The Oncologist**, v. 12, n. 12, p. 1395–1403, 2007.

LENT, ROBERTO. **Cem bilhões de neurônios: conceitos fundamentais de neurociência**. São Paulo. Editora Atheneu, 2001.

LIU, L. et al. MAP1S enhances autophagy to suppress tumorigenesis. **Autophagy**, v. 8, n. 2, 2012.

LIU, W. J. et al. P62 Links the Autophagy Pathway and the Ubiquitin–Proteasome System Upon Ubiquitinated Protein Degradation. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v. 21, n. 1, p. 29, 2016.

LOUIS, D. N. et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. **Acta Neuropathologica**, v. 131, n. 6, p. 803–820, 2016.

MURAGUCHI, T. et al. RECK modulates Notch signaling during cortical neurogenesis by regulating ADAM10 activity. **Nature Neuroscience**, v. 10, n. 7, p. 838–845, 2007.

NATSUMEDA, M. et al. Induction of autophagy in temozolomide treated malignant gliomas. **Neuropathology**, v. 31, n. 5, p. 486–493, 2011.

NATSUMEDA, M. et al. Targeting Notch Signaling and Autophagy Increases Cytotoxicity in Glioblastoma Neurospheres. **Brain Pathology**, v. 26, n. 6, p. 713–723, 2016.

NIXON, R. A. et al. Autophagy and Neuronal Cell Death in. 2013.

OH, J. et al. The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis. **Cell**, v. 107, n. 6, p. 789–800, 2001.

PAVLOVI, M. et al. Epidemiology of central nervous system tumors Epidemiology of central nervous system tumors. n. January, p. 84–86, 2002.

PUDUVALLI, V. K.; HOANG, N. Chemotherapy of High-Grade Astrocytomas in Adults. v. 31, p. 116–144, 2018.

RAMIRO, F. C.; GOMES, R. P.; PESENTI, E. C.; WINNISCHOFER, S. M. B. Analysis of DNA microarray data for identification of resistance biomarkers in human glioblastoma model. Monografia apresentada à Escola de Saúde do Centro Universitário Autônomo do Brasil – UNIBRASIL, 2017.

RANGANATHAN, P.; WEAVER, K. L.; CAPOBIANCO, A. J. Notch signalling in solid tumours: A little bit of everything but not all the time. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, n. 5, p. 338–351, 2011.

REUSS, D. E. et al. ATRX and IDH1 - R132H immunohistochemistry with subsequent copy number analysis and IDH sequencing as a basis for an “ integrated ” diagnostic approach for adult astrocytoma , oligodendroglioma and glioblastoma. p. 133–146, 2015.

ROSENFELDT, M. T.; RYAN, K. M. The multiple roles of autophagy in cancer. **Carcinogenesis**, v. 32, n. 7, p. 955–963, 2011.

SARKAR, S. et al. Activation of NOTCH signaling by Tenascin-C promotes growth of human brain tumor-initiating cells. **Cancer Research**, v. 77, n. 12, p. 3231–3243, 2017.

TAO, Z. et al. Autophagy suppresses self-renewal ability and tumorigenicity of gliomainitiating cells and promotes Notch1 degradation. 2018.

TAYLOR, J. W.; SCHIFF, D. Treatment considerations for MGMT-unmethylated glioblastoma. **Current neurology and neuroscience reports**, v. 15, n. 1, p. 507, 2015.

THAKKAR, J. P. et al. Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, v. 23, n. 10, p. 1985–1996, 2014.

TROMBETTA-LIMA, M. et al. Isolation and characterization of novel RECK tumor suppressor gene splice variants. v. 6, n. 32, 2015.

WEISWALD, L.; BELLET, D.; DANGLES-MARIE, V. Spherical Cancer Models in Tumor. **NEO**, v. 17, n. 1, p. 1–15, 2015.

WOLFE, D. M. et al. Autophagy failure in Alzheimer ’ s disease and the role of defective lysosomal acidification. v. 37, n. December 2012, p. 1949–1961, 2013.

YAN, Y. et al. Targeting autophagy to sensitive glioma to temozolomide treatment. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, p. 1–14, 2016.

ZHANG, X. et al. Archives of Oral Biology The clinicopathologic relevance of RECK gene polymorphisms in ameloblastoma. **Archives of Oral Biology**, v. 79, p. 77–86, 2017.